

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR

JOÃO VICTOR CAPELLI PEIXOTO

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO DE ENDURANCE E  
DO TREINAMENTO INTERVALADO NO MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS  
DIABÉTICOS

CURITIBA  
2019

JOÃO VICTOR CAPELLI PEIXOTO

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO DE ENDURANCE E  
DO TREINAMENTO INTERVALADO NO MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS  
DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Doutor em  
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA  
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Peixoto, João Victor Capelli

Estudo comparativo dos efeitos do treinamento de endurance e do treinamento intervalado no músculo diafragma de ratos diabéticos. / João Victor Capelli Peixoto. – Curitiba, 2019.  
105 p.: il.

Orientador: Rosalvo T. H. Fogaça

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Diabetes Mellitus 2. Treino aeróbico 3. Consumo de oxigênio 4. Estresse oxidativo I. Título II. Fogaça, Rosalvo T. H. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.12



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISIOLÓGIA -  
40001016072P4

### TERMO DE APROVAÇÃO


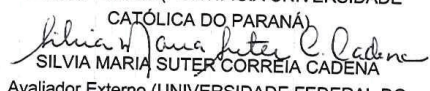
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **JOAO VICTOR CAPELLI PEIXOTO**, intitulada: **"ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO DE ENDURANCE E DO TREINAMENTO INTERVALADO NO MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS DIABÉTICOS"**, sob orientação do Prof. Dr. ROSALVO TADEU HOCHMULLER FOGAÇA, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de Setembro de 2019.

  
ROSALVO TADEU HOCHMULLER FOGAÇA  
Presidente da Banca Examinadora

  
ANDRE LUIZ FELIX RODACKI  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
RICARDO AURINO DE PINHO  
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)  
  
SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Este trabalho é dedicado à Rafaela Menezes  
Peixoto, a minha menininha, o meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo berço onde nasci.

A meus pais Ecléia Capelli Peixoto e Claudio Aurélio Peixoto pelo amor e educação que me deram, por serem meu porto seguro e meu alicerce sólido.

À minha irmã Janaína Capelli Peixoto pelo amor pela motivação e apoio.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rosalvo T.H. Fogaça por me orientar, por acreditar na minha capacidade e compartilhar comigo seu conhecimento.

Ao Professor Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias por toda assistência e orientação ao longo desse período.

À Professora Dra. Ilana Kassouf Silva pela orientação e pelas boas conversas.

À Professora Dra. Silvia Suter Cadena pela importante colaboração nos experimentos de respiração mitocondrial, pelas boas idéias e pelo incentivo.

À Professora Dra. Alexandra Acco pela importante colaboração nos experimentos de estresse oxidativo.

A Anderson Lorenzatto, pela oportunidade profissional ao longo de todos esses anos.

Ao meu neurologista, Dr. Alexandro Tamanini, pela colaboração e pelo atendimento durante todos esses anos.

Aos meus colegas de pós-graduação Pedro Felipe Chaves, Carlos Henrique Pereira, Claudia Rita Corso, Ana Luiza Furlanetto, Cibele Dias Ribeiro, Marcelo Cardoso Ferrari, Cláudio Antônio Rank Filho e Larisson Murilo de Paula, pelos momentos agradáveis que passamos no laboratório e por toda colaboração prestada durante o projeto.

A Claudio Augusto Fontana, Jeferson Eurich, Leandro Tomazoni, Roque Santi, Nelson Tomasin Jr, Nelson Fernandes Jr, Marco Antônio Guimarães, Henrique Higashi, Vitor Bastos Martins e Daphne Fisher por acreditarem no meu trabalho e dividirem comigo bons momentos durante esses anos.

À minha mulher Franciele Rigloski Menezes, por todo o amor, carinho, apoio e, por estar sempre ao meu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo e à Fundação Araucária pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço a todos os funcionários do Setor de Ciências Biológicas e a todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

“O dado mais importante que separa o ser humano de todos os seus irmãos e primos na escala filogenética é o conhecimento. Só o conhecimento liberta o homem. Só através do conhecimento o homem é livre. E em sendo livre ele pode aspirar uma condição melhor de vida para si e todos os seus semelhantes”.

Enéas Carneiro

## RESUMO

Pacientes portadores de *diabetes mellitus* (DM) com baixo controle glicêmico podem apresentar disfunção do músculo diafragma e redução da capacidade respiratória. Entretanto, os mecanismos envolvidos na disfunção respiratória no DM não estão esclarecidos. A prática regular de exercícios físicos é um importante promotor de saúde e qualidade de vida para os praticantes, podendo prevenir ou retardar as consequências da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de trinta sessões de natação forçada, realizadas durante seis semanas, nas modalidades endurance e intervalado de alta intensidade sobre a contratilidade muscular, parâmetros mitocondriais e de estresse oxidativo no músculo diafragma de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. A contratilidade do diafragma foi adquirida utilizando músculos isolados, os parâmetros mitocondriais através do fluxo de oxigênio pela cadeia de transporte de elétrons e o estresse oxidativo através de ensaio enzimático. Nossos dados de contratilidade revelaram em todos os grupos DM redução na velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) e na velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ). Porém, o grupo DM intervalado apresentou aumento significativo na força tetânica máxima ( $4.35 \pm 0.12$  vs.  $3.66 \pm 0.17$  N/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.012$ )) e na resistência à fadiga ( $97.44 \pm 6.29$  vs.  $71.00 \pm 3.90$  segundos ( $p = 0.011$ )) quando comparado ao grupo DM sedentário. Os dados de estresse oxidativo mostraram nos grupos DM não haver diferenças significativas na concentração de espécies reativas de oxigênio ( $p = 0.436$ ) e na peroxidação lipídica tecidual ( $p = 0.567$ ), associado ao aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). No grupo DM endurance, a atividade da SOD estava aumentada 85% comparado ao grupo DM sedentário ( $p = 0.024$ ) e 87.9% comparado ao grupo DM intervalado ( $p = 0.010$ ), indicando que para os animais diabéticos sem controle glicêmico, as atividades físicas prolongadas e de baixa intensidade podem estimular o estresse oxidativo no músculo diafragma.

Palavras chave: *Diabetes Mellitus*, músculo diafragma, treino intervalado de alta intensidade, treino de endurance, consumo de oxigênio, estresse oxidativo



## ABSTRACT

Patients with *diabetes mellitus* (DM) with poor glycemic control may present diaphragm muscle dysfunction and reduced respiratory capacity. However, the mechanisms involved in respiratory dysfunction in DM are not clear. The regular practice of physical exercises is an important promoter of health and quality of life for the practitioners and may prevent or delay the consequences of the disease. The aim of this study was to evaluate the effect of thirty forced swimming sessions during six weeks of interval or endurance training on diaphragm muscle contractility, mitochondrial and oxidative stress parameters in streptozotocin-treated diabetic rats. Diaphragm contractility was acquired using isolated muscles, mitochondrial parameters through oxygen flow through the electron transport chain and oxidative stress through enzymatic assay. Our contractility data revealed in all DM groups a reduction in maximum speed of contraction (+dF/dt) and maximum speed of relaxation (-dF/dt). However, the interval DM group showed a significant increase in maximum tetanic force ( $4.35 \pm 0.12$  vs.  $3.66 \pm 0.17$  N/cm<sup>2</sup> ( $p = 0.012$ )) and in resistance to fatigue ( $97.44 \pm 6.29$  vs.  $71.00 \pm 3.90$  seconds ( $p = 0.011$ )) when compared to sedentary DM group. Oxidative stress data showed in DM groups no significant differences in reactive oxygen species concentration ( $p = 0.436$ ) and tissue lipid peroxidation ( $p = 0.567$ ), associated with significant increase in the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In DM endurance group, SOD activity was increased 85% compared to sedentary DM group ( $p = 0.024$ ) and 87.9% compared to interval DM group ( $p = 0.010$ ), indicating that for diabetic animals without glycemic control, prolonged and low intensity physical activities may stimulate oxidative stress in the diaphragm muscle.

Key words: *Diabetes Mellitus*, diaphragm muscle, high intensity interval training, endurance training, oxygen consumption, oxidative stress

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REGISTRO DA PRODUÇÃO DE FORÇA ISOMÉTRICA DO MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO.....	73
FIGURA 2A- FORÇA ISOMÉTRICA MÁXIMA (TMÁX) DURANTE CONTRAÇÕES REPETIDAS DOS GRUPOS CONTROLE.....	74
FIGURA 2B- FORÇA ISOMÉTRICA MÁXIMA (TMÁX) DURANTE CONTRAÇÕES REPETIDAS DOS GRUPOS DM.....	75
FIGURA 2C- FORÇA ISOMÉTRICA MÁXIMA (TMÁX) DURANTE CONTRAÇÕES REPETIDAS DOS GRUPOS SEDENTÁRIOS.....	75
FIGURA 2D- FORÇA ISOMÉTRICA MÁXIMA (TMÁX) DURANTE CONTRAÇÕES REPETIDAS DOS GRUPOS ENDURANCE.....	76
FIGURA 2E- FORÇA ISOMÉTRICA MÁXIMA (TMÁX) DURANTE CONTRAÇÕES REPETIDAS DOS GRUPOS INTERVALADO.....	76
FIGURA 3A- VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO (+dF/dt) DOS GRUPOS CONTROLE.....	78
FIGURA 3B- VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO (+dF/dt) DOS GRUPOS DM.....	78
FIGURA 3C- VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO (+dF/dt) DOS GRUPOS SEDENTÁRIOS.....	79
FIGURA 3D- VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO (+dF/dt) DOS GRUPOS ENDURANCE.....	79
FIGURA 3E- VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO (+dF/dt) DOS GRUPOS INTERVALADO.....	80
FIGURA 4A- VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO (-dF/dt) DOS GRUPOS CONTROLE.....	81
FIGURA 4B- VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO (-dF/dt) DOS GRUPOS DM.....	81
FIGURA 4C- VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO (-dF/dt) DOS GRUPOS SEDENTÁRIOS.....	82
FIGURA 4D- VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO (-dF/dt) DOS GRUPOS ENDURANCE.....	82

FIGURA 4E- VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO ( $-dF/dt$ ) DOS GRUPOS INTERVALADO.....	83
FIGURA 5- FORÇA TETÂNICA MÁXIMA ( $F_{MÁX}$ ).....	84
FIGURA 6- RESISTÊNCIA À FADIGA.....	84
FIGURA 7- CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL.....	85
FIGURA 8- ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO TECIDUAL TOTAL.....	86
FIGURA 9- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA TECIDUAL.....	86
FIGURA 10- ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE TECIDUAL.....	87
FIGURA 11- ATIVIDADE DE CATALASE TECIDUAL.....	88

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC- acil-CoA carboxilase

Ach- acetilcolina

ACTH- hormônio adreno corticotrófico

AEC- acoplamento excitação contração

Akt- proteína quinase B

AMPC- adenosina monofosfato cíclico

AMPK- proteína quinase ativada por AMP

ATGL- lipase adiposa do triglicerídeo

CaMK- cálcio calmodulina quinase

CAT- catalase

CSQ- calsequestrina

+dF/dt- velocidade de produção de força em função do tempo

-dF/dt- velocidade de redução de força em função do tempo

DHEA- diidroepiandrosterona

DHPR- receptores diidropiridínicos

DHT- diidrotestosterona

DM- *Diabetes Mellitus*

EPOC- consumo excessivo de oxigênio após o exercício

ERK 1/2- quinase regulada por sinal extracelular

ERR $\alpha$ - receptor alfa relacionado a estrogênio

FAK- quinase de adesão focal

FAS- sintase de ácido graxo

FGF- fator de crescimento do fibroblasto

FoxO- Forkhead Box O

FP2ase- frutose 1,6 bifosfatase

G6Pase- glicose 6 fosfatase  
GLUT- transportador de glicose  
GH- hormônio do crescimento  
GHRH- hormônio liberador de GH  
GPX- glutathione peroxidase  
GR- glutathione reductase  
GSH- glutathione reduzida  
GSK3- glicogênio sintase quinase 3  
GSSG- glutathione oxidada  
HDAC- desacetilador nuclear de histona  
HGF- fator de crescimento do hepatócito  
HIF-1- fator induzido por hipóxia 1  
HNF-4- fator nuclear do hepatócito 4  
HSD- hidroxisteróide desidrogenase  
HSL- lipase hormônio sensível  
IGF-1- fator de crescimento da insulina  
IL-1 $\beta$ - interleucina 1 beta  
IL-4- interleucina 4  
IL-6- interleucina 6  
IL-10- interleucina 10  
iNOS- óxido nítrico sintase induzível  
IP3- inositol 1,4,5 trifosfato  
IP3R- receptor de inositol 1,4,5 trifosfato  
IRS-1- substrato do receptor de insulina  
JAK- Janus quinase  
LPL- lipoproteína lipase  
MAFBx- Muscle-specific Atrophy F Box

MAGL- lipase monoacilglicerol

MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno

MEC- matriz extracelular

MEF2- fator de crescimento do miócito 2

MHC- miosina de cadeia pesada

MMPs- metaloproteases

MRFs- fatores de regeneração miofibrilar

mTOR- alvo no mamífero da rapamicina

MuRF-1- Muscle Ring Finger-1

NCX- trocador sódio cálcio

NFAT- fator nuclear das células T ativadas

NFκB- Fator Nuclear kappa beta

NGF- fator de crescimento do nervo

NOX- dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase

NRF-1- fator de respiração nuclear 1

NRF-2- fator de respiração nuclear 2

PCO<sub>2</sub>- pressão parcial de dióxido de carbono

PDK- piruvato desidrogenase quinase

PEPCK- fosfoenol piruvato carboxilase

PGC-1α- Proliferador de Peroxisomo Receptor-γ Co-ativador-1α

PI3K- inositol trifosfato quinase

PIP2- fosfoinositol 4,5 bifosfato

PKA- proteína quinase dependente de AMPc

PLC- fosfolipase C

PLIN1- perilipina-1

PLN- fosfolambano

PMCA- cálcio ATPase da membrana plasmática

PO<sub>2</sub>- pressão parcial de oxigênio

PPAR- Receptor Ativado por Proliferador de Peroxisomo

RNA<sub>m</sub>- ácido ribonucleico mensageiro

ROS- espécie reativa de oxigênio

RS- retículo sarcoplasmático

RyR- receptores de rianodina

SERCA- cálcio ATPase do RS

SLN- sarcolipina

SOD- superóxido dismutase

STAT- transdutor de sinal e ativador de transcrição

Tfam- fator de transcrição mitocondrial

TGF-β- fator de crescimento transformador beta

TIMPs- inibidor tecidual de metaloproteases

TNF-α- fator de necrose tumoral alfa

TRIZMA- Hidroximetil amino metano

TSC2- complexo tuberoso esclerótico

ULK-1- quinase ativada por autofagia

VEGF- fator de crescimento vaso endotelial

VO<sub>2</sub>máx- consumo máximo de oxigênio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{CaCl}_2$ - Cloreto de cálcio

$\text{CO}_2$ - dióxido de carbono

$\text{H}_2\text{CO}_3$ - ácido carbônico

$\text{H}_2\text{O}$ - Água

$\text{H}_2\text{O}_2$ - peróxido de hidrogênio

$\text{HCl}$ - Ácido clorídrico

$\text{HCO}_3^-$  - bicarbonato

$\text{KCl}$ - Cloreto de potássio

$\text{MgCl}_2$ - Cloreto de magnésio

$\text{NaCl}$ - Cloreto de sódio

$\text{NaOH}$ - Hidróxido de sódio

$\text{O}_2^{\circ-}$  -ânion superóxido

$^{\circ}\text{OH}^{\circ}$  - radical hidroxila

$\text{Pi}$ - fosfato inorgânico



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	23
1.2 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	27
<b>1.2.1 Contração muscular.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2 Ciclo das pontes cruzadas.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.3 Relaxamento muscular.....</b>	<b>29</b>
1.3 TIPOS DE FIBRA MUSCULAR.....	29
1.4 TREINAMENTO FÍSICO.....	31
1.5 TRANSIÇÃO DO REPOUSO PARA O EXERCÍCIO.....	33
1.6 MANUTENÇÃO DA DEMANDA ENERGÉTICA DURANTE O EXERCÍCIO.....	34
<b>1.6.1 Metabolismo hepático durante o exercício.....</b>	<b>35</b>
<b>1.6.2 Metabolismo do tecido adiposo durante o exercício.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6.3 Metabolismo do músculo esquelético durante o exercício.....</b>	<b>40</b>
1.7 NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	42
1.8 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TREINO INTERVALADO .....	44
1.9 ADAPTAÇÃO AO TREINO INTERVALADO.....	45
<b>1.9.1 Ajustes hormonais.....</b>	<b>46</b>
<b>1.9.2 Aumento no recrutamento de unidades motoras.....</b>	<b>46</b>
<b>1.9.3 Inchaço muscular.....</b>	<b>47</b>
1.10 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	47
<b>1.10.1 Via do IGF-1/mTOR.....</b>	<b>47</b>
<b>1.10.2 Via do MAPK.....</b>	<b>48</b>
<b>1.10.3 Vias dependentes de <math>\text{Ca}^{++}</math>.....</b>	<b>48</b>
1.11 MECANISMOS MOLECULARES PARA A HIPERTROFIA MUSCULAR.....	49
<b>1.11.1 Regeneração do tecido muscular.....</b>	<b>51</b>

1.12 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TREINO DE ENDURANCE.....	52
1.12.1 Catabolismo da glicose.....	53
1.12.2 Catabolismo dos lipídios.....	53
1.12.3 Catabolismo dos aminoácidos.....	55
1.12.4 Ciclo do ácido cítrico.....	56
1.13 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	57
1.13.1 Via do AMPK.....	57
1.13.2 Vias dependentes de $Ca^{++}$ .....	58
1.13.3 Via do MAPK.....	58
1.14 ADAPTAÇÃO AO TREINAMENTO DE ENDURANCE.....	59
1.14.1 Aumento na produção de ROS.....	59
1.14.2 Flexibilidade metabólica.....	60
1.14.3 Biogênese mitocondrial.....	60
1.14.4 Conversão dos tipos de fibra muscular.....	61
1.14.5 Angiogênese.....	61
1.15 JUSTIFICATIVA.....	62
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
2.1 GERAIS.....	64
2.2 ESPECÍFICOS.....	64
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1 ANIMAIS.....	65
3.2 INDUÇÃO DE DM.....	65
3.3 PROTOCOLOS DE NATAÇÃO FORÇADA.....	65
3.4 ORGANIZAÇÃO DAS SESSÕES DE TREINAMENTO E DOS EXPERIMENTOS.....	66
3.5 PARÂMETROS CONTRÁTEIS DE MÚSCULO DIAFRAGMA <i>IN VITRO</i> .....	67
3.6 CONSUMO DE $O_2$ MITOCONDRIAL.....	68

3.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	69
3.7.1 MENSURAÇÃO DE ROS TOTAL.....	69
3.7.2 ATIVIDADE DE SOD.....	70
3.7.3 ATIVIDADE DE CAT.....	70
3.7.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA TECIDUAL (LPO).....	70
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
4.1 PESO DOS ANIMAIS.....	72
4.2 GLICEMIA.....	72
4.3 PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE COM MÚSCULO DIAFRAGMA.....	72
<b>4.3.1 Força isométrica máxima durante contrações repetidas (T<sub>máx</sub>).....</b>	<b>73</b>
<b>4.3.2 Velocidade máxima de contração (+dF/dt).....</b>	<b>77</b>
<b>4.3.3 Velocidade máxima de relaxamento (-dF/dt).....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.4 Força tetânica máxima (F<sub>máx</sub>).....</b>	<b>83</b>
<b>4.3.5 Resistência à fadiga.....</b>	<b>84</b>
4.4 CONSUMO DE O <sub>2</sub> MITOCONDRIAL.....	85
4.5 PARÂMETROS OXIDATIVOS.....	85
<b>4.5.1 ROS tecidual total.....</b>	<b>85</b>
<b>4.5.2 Peroxidação lipídica tecidual (LPO).....</b>	<b>86</b>
<b>4.5.3 Atividade de SOD tecidual.....</b>	<b>87</b>
<b>4.5.4 Atividade de CAT tecidual.....</b>	<b>87</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença metabólica de origem múltipla, decorrente da falta de insulina, caracterizando o DM tipo 1 e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente sua sinalização, caracterizando o DM tipo 2. Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes, haviam em 2015, 415 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos com diabetes no mundo. No Brasil o número de pacientes diagnosticados com DM aumentou 61,8% em 10 anos, passando de 5,5% da população em 2006 para 8,9% em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Em 2017, 12,5 milhões de brasileiros eram diabéticos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

O tecido muscular esquelético é o maior alvo para a captação de glicose e consequentemente um importante promotor da homeostase da glicose no organismo (HAWLEY; LESSARD, 2008). No DM, a redução ou inabilidade dos tecidos captarem glicose, faz com que esta permaneça no plasma, gerando hiperglicemia e déficit energético, gatilhos para uma série de eventos metabólicos e celulares, que atenuam processos de síntese, para preservar energia e, estimulam processos catabólicos, para a manutenção da síntese de ATP (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015; TSILOULIS; WATT, 2015; VIJAYAKUMAR et al., 2010).

A resposta metabólica ao déficit energético ocorre através da secreção de hormônios como glucagon, cortisol e GH, que atuam no tecido adiposo, estimulando a liberação de ácidos graxos livres na circulação sanguínea, nos músculos, estimulando a proteólise e o aumento na captação e utilização de ácidos graxos como principal substrato energético e no fígado, estimulando a gliconeogênese (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015; TSILOULIS; WATT, 2015; VIJAYAKUMAR et al., 2010).

A resposta celular ao déficit energético ocorre através da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que fosforila proteínas específicas como Forkhead Box O (FoxO), estimulando a expressão das ubiquitina ligases Muscle Ring Finger (MuRF-1) e Muscle-specific Atrophy F Box (MAFBx), também conhecido como Atrogina-1, cuja função é degradar proteínas contráteis, disponibilizando aminoácidos como substrato para serem utilizados em eventos hepáticos e,

estimulando a transcrição e atividade de Proliferador de Peroxisomo Receptor- $\gamma$  Co-ativador-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), principal regulador da biogênese mitocondrial (COFFEY; HAWLEY, 2007; GLASS, 2005; HOPPELER, 2016; JI, 2015).

O aumento na captação de ácidos graxos pelas células musculares e a atividade de PGC-1 $\alpha$  estimulam a atividade do fator de transcrição Receptor Ativado por Proliferador de Peroxisomo (PPAR), que nas mitocôndrias estimulam vias da  $\beta$ -oxidação, aumentando a síntese ATP a partir de ácidos graxos (HOPPELER, 2016; JI, 2015).

Nas cadeias de transporte de elétrons mitocondriais, as vias de síntese de ATP dependentes de oxigênio, como a fosforilação oxidativa e a  $\beta$ -oxidação são sítios de produção de radicais livres, moléculas instáveis e reativas. Uma pequena porção de elétrons vaza da cadeia de transporte de elétrons, no complexo I e no complexo III e, é captado por oxigênio molecular, formando  $O_2^{\bullet-}$ , uma espécie reativa de oxigênio (ROS) (JI, 2015; KERKSICK; ZUHL, 2014).

Se a síntese de agentes oxidantes não é acompanhada da síntese de agentes antioxidantes, gera-se estresse oxidativo. Nas células, ROS atuam como segundo mensageiro e pode ativar o Fator Nuclear kappa beta (NF $\kappa$ B), fator de transcrição que estimula a expressão de genes antioxidantes, protegendo contra o estresse oxidativo. A perturbação do balanço redox com prevalência dos agentes oxidantes podem estimular a atividade de vias proteolíticas, como MuRF-1, promovendo degradação do tecido muscular (GLASS, 2005; JI, 2015; KAMATA et al., 2002).

A prevalência da proteólise em relação à síntese proteica muscular culmina na redução da massa e da produção de força muscular, fatores que podem levar o paciente a apresentar limitações nas atividades diárias (VAN LUNTEREN; MOYER, 2009; WANKE et al., 1991).

Pacientes portadores de DM, com pobre controle glicêmico, podem apresentar disfunção do músculo diafragma e diminuição da capacidade respiratória (VAN LUNTEREN; MOYER, 2009; WANKE et al., 1991). Índices respiratórios como capacidade vital, pico de pressão transdiafragmática, pressão inspiratória máxima, pressão expiratória máxima e resistência ao endurance do músculo diafragma podem estar reduzidos em exames funcionais (WANKE et al., 1991, 1992).

Em condições experimentais, são relatadas no músculo diafragma alterações contráteis e na produção de força (SALVI et al., 2010; VAN LUNTEREN;

MOYER, 2009), aumento na proporção de fibras do tipo I e atrofia de fibras do tipo II (BESTETTI et al., 1981), aumento na expressão de genes relacionados à proteólise, aumento na expressão de genes antioxidantes, aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (VAN LUNTEREN; MOYER, 2009), aumento na densidade mitocondrial e no número de células satélite (BESTETTI et al., 1981).

Os mecanismos envolvidos na disfunção respiratória não são claros, porém similares no DM tipo 1 e tipo 2 (MOHAMAD et al., 2015; UZ- ZAMAN, 2014). O estresse oxidativo, a glicação de proteínas e lipídios, o aumento na expressão de genes proteolíticos e a dislipidemia podem aumentar as complicações da doença (KIZUB; KLYMENKO; SOLOVIEV, 2014; VAN LUNTEREN; MOYER, 2009).

Para diabéticos, além do controle glicêmico, é recomendada a prática regular de exercícios físicos (MUÑOZ et al., 2018). De grande interesse social, os exercícios físicos são importantes promotores de saúde e qualidade de vida para os praticantes (POWERS, 2017). A prática regular resulta em adaptações no tecido muscular esquelético, protegendo-os contra a deterioração promovida pelo estresse oxidativo e a proteólise (MUSI; YU; GOODYEAR, 2003). Ainda promove redução na concentração de glicose sanguínea e melhora do perfil lipídico, o que pode prevenir o desenvolvimento da doença ou reduzir os efeitos colaterais (MUSI; YU; GOODYEAR, 2003).

O treinamento físico pode ser dividido em dois tipos: contínuo ou endurance e intervalado (SHEFER; BENAYAHU, 2012). O objetivo do treinamento de endurance é aumentar a capacidade aeróbia, enquanto do treinamento intervalado é aumentar a capacidade anaeróbia (FRONTERA; OCHALA, 2015; OGURA et al., 2005), porém no músculo diafragma as adaptações aos tipos de treinamento são diferentes daquelas observadas nos músculos periféricos (OGURA et al., 2005).

Durante o treinamento de endurance, o estresse metabólico imposto pelo exercício ao diafragma é pequeno. Porém, durante o treinamento intervalado, a demanda anaeróbia resulta em aumento na carga de trabalho do diafragma, não apenas durante as séries de alta intensidade, mas também durante períodos de recuperação onde existe compensação respiratória para a acidose metabólica e ainda, durante os períodos após o exercício devido ao EPOC (consumo excessivo de oxigênio após o exercício), gerando adaptações aeróbicas em maiores magnitudes quando comparado ao treino de endurance (OGURA et al., 2005).

A resposta indesejada da adaptação aeróbica é a redução da produção de força devido à atrofia adaptativa (POWERS; COOMBES; DEMIREL, 1997), porém, outras adaptações podem ser benéficas, prevenindo ou reduzindo os efeitos deletérios do DM (MUSI; YU; GOODYEAR, 2003). Não foram encontrados dados na literatura que relatem os efeitos adaptativos do treino de endurance ou do treino intervalado no músculo diafragma de animais diabéticos.

## 1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO

Cada músculo esquelético é composto de células musculares, denominadas fibras musculares. As fibras musculares esqueléticas são multinucleadas com aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e centímetros de comprimento. São mantidas unidas por uma delgada membrana de tecido conjuntivo chamado fáscia. A fáscia que envolve a membrana celular de cada fibra muscular é chamada endomísio. As fibras musculares são unidas em feixes, os fascículos, por uma fáscia chamada perimísio. E finalmente a fáscia que envolve o músculo todo é chamada de epimísio (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Se observadas em um microscópio, as miofibrilas parecem ser estriadas transversalmente pela presença de faixas claras e escuras. As faixas escuras são chamadas bandas anisotrópicas ou banda A. As faixas claras são chamadas bandas isotrópicas ou banda I. No centro de cada banda I estão as linhas Z, que segmentam as miofibrilas em uma série de unidades repetitivas, os sarcômeros, unidade contrátil básica do músculo estriado. No centro dos sarcômeros encontra-se a zona H e, no centro da zona H encontra-se a linha M (SWEENEY; HAMMERS, 2018).

O sarcômero é composto de dois tipos distintos de filamentos orientados longitudinalmente, os filamentos grossos, compostos por miosina e os filamentos finos, compostos por actina e por proteínas regulatórias tropomiosina e o complexo troponina, formado por troponina T (ligado a tropomiosina), troponina I (inibe o sítio ativo da actina) e troponina C (sítios de ligação do íon cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ )). Os filamentos grossos são encontrados apenas na banda A e na zona H e, ancorados na linha M pela proteína miomesina. Os filamentos finos ocupam a banda I e parte da banda A, ancorados na linha Z pela proteína  $\alpha$  actinina. Na banda A os filamentos se sobrepõem em um arranjo hexagonal dos filamentos finos ao redor de um filamento

grosso (FRONTERA; OCHALA, 2015; HENDERSON et al., 2017; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

Diversas proteínas contribuem para a organização e estabilização do sarcômero, como a proteína elástica titina, que estabiliza e alinha os filamentos grossos, ancorando-os às linhas Z, influenciando a tensão passiva e a rigidez estrutural da célula muscular. A proteína nebulina alinha e estabiliza os filamentos finos, ancorando-se às linhas Z pela proteína capa Z. Na outra extremidade dos filamentos finos, a proteína de capeamento tropomodulina previne a despolimerização dos filamentos finos. A proteína desmina ancora as linhas Z terminais ao sarcolema (FRONTERA; OCHALA, 2015; HENDERSON et al., 2017; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

Os costâmeros são um complexo proteico de ancoramento que realizam mecanotransdução. São formados pelas proteínas vinculina, talina, integrina e distrofina. Conectam mecanicamente o sarcolema com a matriz extracelular (MEC), transmitindo a força gerada, do sarcômero para a MEC. Vinculina conecta os filamentos finos ao sarcolema. Talina conecta vinculina às integrinas. As integrinas conectam-se à MEC. A proteína distrofina conecta o citoesqueleto à MEC (HENDERSON et al., 2017).

A transmissão de força da MEC para a célula muscular ocorre via receptores integrinas do tipo tirosina quinase. O estímulo mecânico ativa o receptor, que se autofosforila e, fosforila proteínas específicas, ativando-as, como as quinases de adesão focal (FAK). FAK fosforila outras proteínas específicas ou fatores de transcrição, ativando vias de sinalização intracelular que promovem diferentes adaptações a diferentes tipos de estímulos mecânicos (HENDERSON et al., 2017; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

Outros elementos celulares como o sistema tubular transversal (túbulos T), retículo sarcoplasmático (RS) e rede mitocondrial, compõem a célula muscular.

Os túbulos T são uma invaginação do sarcolema, cujo papel é conduzir os potenciais de ação da superfície para o interior da fibra e garantir que a despolarização da membrana se espalhe uniformemente, desencadeando a contração muscular. É onde estão ancorados os receptores diidropiridínicos (DHPR), canais de  $\text{Ca}^{++}$  tipo L dependentes de voltagem (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015).



O RS é uma organela altamente especializada, localizado ao longo dos sarcômeros. Suas funções são armazenagem, liberação e recaptação de  $\text{Ca}^{++}$ , necessários para a contração e o relaxamento muscular. Consiste de uma porção larga, denominada cisterna terminal e uma porção alongada, denominada RS longitudinal. Essa divisão torna a cisterna terminal responsável pela liberação de  $\text{Ca}^{++}$  e a porção longitudinal responsável pela recaptação de  $\text{Ca}^{++}$  (REDDISH et al., 2017; RIGOARD et al., 2009).

No músculo esquelético, o RS é localizado à frente dos túbulos T, espaço denominado zona juncional. Um túbulo T e uma cisterna terminal são chamados de díade e um túbulo T e duas cisternas terminais são chamados de tríade (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015; REDDISH et al., 2017).

Diversas proteínas são associadas ao RS, como os canais de  $\text{Ca}^{++}$  do RS, denominados receptores de rianodina (RyR) e receptores inositol 1,4,5 trifosfato (IP3R), a  $\text{Ca}^{++}$  ATPase do RS, SERCA (sarco endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{++}$  ATPase), proteínas regulatórias da SERCA, fosfolambano (PLN) e sarcolipina (SLN), uma proteína relacionada com o armazenamento de  $\text{Ca}^{++}$  no lúmen do RS, calsequestrina (CSQ), além de proteínas que organizam o RS, triadina e junctina (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FAJARDO et al., 2013; FRONTERA; OCHALA, 2015; PERIASAMY et al., 2017; REDDISH et al., 2017).

Os RyR são localizados exclusivamente na membrana da cisterna terminal do RS, frente à frente com os DHPR na zona juncional, constituindo uma unidade de liberação de  $\text{Ca}^{++}$  ativados em resposta ao potencial de ação. No músculo esquelético é encontrado a isoforma RyR1 que consiste de duas porções, uma porção citosólica, de formato parecido a um cogumelo e, uma porção embebida na membrana da cisterna terminal do RS. Os RyR interagem com o lúmen do RS através das proteínas CSQ, junctina e triadina (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015; REDDISH et al., 2017).

Os IP3R presentes no músculo esquelético são homólogos aos RyR1. O inositol trifosfato (IP3) é gerado como segundo mensageiro da quebra do fosfoinositol 4,5 bifosfato (PIP2) pela fosfolipase C (PLC), quando hormônios se ligam a receptores de membrana na célula muscular e ativam proteínas G específicas. IP3 ativa o canal, estimulando a liberação de  $\text{Ca}^{++}$ , similar aos RyR1.

IP3R podem ser fosforilados por PKA, PKB e MAPK, aumentando a possibilidade de abertura do canal (REDDISH et al., 2017).

O principal mecanismo que remove o  $\text{Ca}^{++}$  do citoplasma no músculo esquelético é a  $\text{Ca}^{++}$  ATPase do RS, SERCA, localizada exclusivamente na porção longitudinal do RS (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FAJARDO et al., 2013; PERIASAMY et al., 2017; REDDISH et al., 2017).

SERCA pertence à família das ATPases tipo P que incluem PMCA,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase. É constituída de uma região transmembrana e uma grande região citoplasmática. Utiliza a energia da hidrólise do ATP para transportar  $\text{Ca}^{++}$  contra o gradiente de concentração do RS pela razão, dois íons  $\text{Ca}^{++}$  para cada ATP hidrolisado. Durante o curso, uma parte da energia química é liberada como calor (PERIASAMY et al., 2017).

SERCA é a proteína mais abundante do RS. No músculo esquelético são encontradas duas isoformas, SERCA 1a e SERCA 2a, expressas de acordo com o tipo de fibra. A capacidade funcional da SERCA pode ser diferenciada pela presença das proteínas regulatórias PLN e SLN. Essas proteínas são expressas de acordo com o tipo de fibra e isoforma de SERCA, regulando de diferentes maneiras a atividade da bomba (FAJARDO et al., 2013; PERIASAMY et al., 2017; REDDISH et al., 2017).

PLB regula principalmente SERCA 2a, enquanto SLN regula tanto SERCA 1a como SERCA 2a. Em baixas concentrações citosólicas de  $\text{Ca}^{++}$ , PLB se liga à SERCA, reduzindo a afinidade da ATPase por  $\text{Ca}^{++}$ , inibindo a recaptção de  $\text{Ca}^{++}$  bem como a hidrólise de ATP. A inibição pode ser removida por fosforilação ou por aumentos no  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático. SLN reduz a velocidade de recaptção de  $\text{Ca}^{++}$ , mas não a atividade da ATPase, promovendo desacoplamento. A redução da atividade da SERCA e a manutenção do gasto energético produzem calor, o que relaciona a atividade de SLN com termogênese, porém os mecanismos de ação da SLN permanecem desconhecidos (FAJARDO et al., 2013; PERIASAMY et al., 2017; SHAIKH et al., 2016).

Após a recaptção, o  $\text{Ca}^{++}$  é armazenado na cisterna terminal do RS, associado com baixa afinidade e alta capacidade à proteína CSQ. CSQ é associada aos RyR através das proteínas junctina e triadina, formando um complexo, organizando estruturalmente o RS para facilitar a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  a cada potencial

de ação. A principal função da CSQ é evitar liberações espontâneas de  $\text{Ca}^{++}$  do RS, evitando a depleção dos estoques intracelulares (REDDISH et al., 2017).

As mitocôndrias geram energia para a contração muscular através da oxidação de glicose, ácidos graxos e metabólitos, quando oxigênio ( $\text{O}_2$ ) é disponível. Algumas mitocôndrias são localizadas adjacentes ao sarcolema, reduzindo a distância de difusão para a oferta do  $\text{O}_2$  e para a remoção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Isso é particularmente importante durante o exercício de endurance, quando a demanda por  $\text{O}_2$  aumenta. Outra população de mitocôndrias está localizada mais profundamente na fibra, no espaço intermiofibrilar (FRONTERA; OCHALA, 2015).

O exercício de endurance estimula o aumento na quantidade e no tamanho das mitocôndrias, estimulando também o aumento no volume de enzimas oxidativas mitocondriais, adaptação que reflete aumento na capacidade oxidativa e na resistência à fadiga do músculo (FRONTERA; OCHALA, 2015).

## 1.2 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O acoplamento excitação-contração (AEC) é uma série de eventos que ocorrem desde a despolarização da membrana plasmática do músculo até a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  do RS (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015).

Durante o potencial de repouso da membrana, devido à condutância seletiva e distribuição iônica através da membrana, gera-se um potencial de aproximadamente -85mV, com o interior da célula negativo em relação ao exterior (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015).

Quando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) é liberado do terminal pré-sináptico do neurônio motor na placa motora, inicia um potencial de placa motora, o qual desencadeia a geração de um potencial de ação na membrana do músculo. O potencial de ação é uma rápida alteração na voltagem da membrana, que pode chegar a +30mV devido ao aumento na condutância, predominando o influxo de íons sódio ( $\text{Na}^{++}$ ), do meio extra para o meio intracelular através de canais dependentes de voltagem (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015).

Um sensor de voltagem no segmento S4 do DHPR detecta variação no potencial de membrana e promove uma alteração conformacional dos DHPR, que se

abrem e interagem mecanicamente com os RyR, provocando sua abertura e permitindo ampla liberação de  $\text{Ca}^{++}$  do RS em direção ao citoplasma (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015).

### **1.2.1 Contração muscular**

O  $\text{Ca}^{++}$  liberado do RS para o citoplasma se liga à troponina C nos filamentos finos, promovendo alteração conformacional e removendo a inibição da troponina I no sítio ativo da actina, permitindo interação da cabeça da miosina com a actina, num processo denominado ciclo das pontes cruzadas (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

### **1.2.2 Ciclo das pontes cruzadas**

A produção de força pelo sistema contrátil é resultado da interação e deslizamento dos filamentos grossos de miosina através dos filamentos finos de actina, associado à hidrólise de ATP (MORRIS; HOMSHER, 1998).

Na ausência do íon  $\text{Ca}^{++}$ , uma parte da população de miosina encontra-se ligada ao ATP, formando o complexo M-ATP. Devido a atividade ATPase da cabeça da miosina, que é independente do íon  $\text{Ca}^{++}$ , forma-se o complexo M-ADP+Pi. Outra parte da população de miosina encontra-se ligada à actina, formando o complexo AM. Na presença de ATP, forma-se o complexo AM-ATP e em decorrência da atividade ATPase da cabeça da miosina, forma-se o complexo AM-ADP+Pi. Todos os complexos, M-ATP, M-ADP+Pi, AM-ATP e AM-ADP+Pi, estão em equilíbrio dinâmico entre si e caracterizam-se por não produzir força, sendo considerados estados de ligação fraca (MORRIS; HOMSHER, 1998).

No sistema contrátil, o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  e a associação deste em sítios específicos na molécula da troponina C, induz modificações alostéricas de todo o complexo troponina-tropomiosina, permitindo que o complexo AM-ADP+Pi passe do estado de ligação fraca para o estado de ligação forte. Acredita-se que a liberação do Pi é o passo limitante entre o estado de ligação fraca e o estado de ligação forte entre os miofilamentos (MORRIS; HOMSHER, 1998).

A cabeça da miosina encontra-se ligada à actina em ângulo de 90 graus em relação a sua cauda. Com a liberação do Pi, forma-se o complexo AM-ADP, a cabeça da miosina muda de conformação de 90 para 45 graus em relação a sua cauda, tracionando o filamento fino de actina em direção a linha M do sarcômero, produzindo força ou movimento de power stroke (MORRIS; HOMSHER, 1998).

Como consequência da liberação do ADP do complexo AM-ADP, forma-se o complexo AM fortemente ligado, também chamado de estado de rigor. A dissociação do complexo AM em A+M é dependente da presença de um novo ATP no sítio de ligação na cabeça da miosina, reformando o complexo M-ATP, alterando a conformação da cabeça da miosina para a posição original de 90 graus. Caso mantenham-se níveis suficientes de  $\text{Ca}^{++}$  e ATP, um novo ciclo de pontes cruzadas ocorrerá (MORRIS; HOMSHER, 1998).

### **1.2.3 Relaxamento muscular**

Após o aumento na concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{++}$  e a produção de tensão, o  $\text{Ca}^{++}$  deve ser removido do citoplasma para que ocorra o relaxamento. O principal mecanismo que remove o  $\text{Ca}^{++}$  do citoplasma no músculo esquelético é a  $\text{Ca}^{++}$  ATPase do RS, SERCA. Em menor escala e com menor importância para o relaxamento muscular, outros mecanismos participam da remoção do  $\text{Ca}^{++}$  do citoplasma, como a  $\text{Ca}^{++}$  ATPase da membrana plasmática (PMCA) e as mitocôndrias (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; STAMMERS et al., 2015; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

A remoção do  $\text{Ca}^{++}$  do citoplasma e o consequente desligamento deste da troponina C, altera a conformação do complexo troponina tropomiosina, que inibe o sítio ativo da actina, impedindo a ligação da cabeça da miosina, resultando em relaxamento muscular (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; STAMMERS et al., 2015; SWEENEY; HAMMERS, 2018).

## **1.3 TIPOS DE FIBRA MUSCULAR**

Diferentes músculos têm diferentes predominâncias de tipos de fibras, o que permite a participação em atividades com demanda metabólica e mecânica.

Os tipos de fibra muscular esquelética são principalmente classificados pela isoforma predominante de miosina de cadeia pesada (MHC), mas também pela isoforma e volume de proteínas envolvidas com a maquinaria molecular responsável pelo AEC (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FITTS, 2007).

A velocidade da hidrólise do ATP e da dissociação do ADP da enzima ATPase presente na cabeça da miosina é o que classifica as isoformas de MHC. A isoforma MHC tipo I é expressa em fibras de contração lenta, avermelhadas devido à presença de mioglobina, com grande volume de mitocôndrias e de enzimas oxidativas. Neste tipo de fibra, a vascularização é intensa, característica que as tornam resistentes à fadiga. A isoforma MHC tipo IIb e IIx são expressas em fibras de contração rápida, de coloração branca, possuem estoque de glicogênio e grande quantidade de enzimas glicolíticas. Estes tipos de fibra são pouco capilarizadas, características que as tornam capazes de gerar muita força, porém são rapidamente fadigáveis. A isoforma MHC tipo IIa é intermediária e possui características tanto de fibras rápidas como de fibras lentas (FITTS, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015; ROCKL et al., 2007).

O volume de proteínas envolvidas na liberação de  $\text{Ca}^{++}$  do RS e remoção de  $\text{Ca}^{++}$  do citoplasma (o que gera o ciclo de  $\text{Ca}^{++}$ ) são características que também podem ser avaliadas pela velocidade de contração ( $+dF/dt$ ) e velocidade de relaxamento ( $-dF/dt$ ) das fibras musculares (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FITTS, 2007).

A SERCA 1a é a isoforma encontrada em fibras de contração rápida, enquanto SERCA 2a é encontrada em fibras de contração lenta. Músculos de contração rápida exibem três a quatro vezes maior concentração de SERCA comparado a músculos de contração lenta. A isoforma e o volume dessa proteína se relacionam diretamente com a velocidade de bombeamento do  $\text{Ca}^{++}$  para o RS, contribuindo para maior velocidade do relaxamento muscular (FAJARDO et al., 2013; PERIASAMY et al., 2017).

Nas fibras de contração rápida é observada a presença de parvalbumina, proteína citoplasmática que tampona o  $\text{Ca}^{++}$  livre, acelerando a recaptção para o RS, influenciando a velocidade do relaxamento (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014).

O ciclo do  $\text{Ca}^{++}$  nas fibras com predominância de MHC tipo IIb e IIx pode ocorrer até sete vezes mais rápido quando comparado as fibras com predominância

de MHC tipo I. As fibras com predominância de MHC tipo IIa apresentam rápida liberação de  $\text{Ca}^{++}$ , porém a recaptção é lenta (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014; FITTS, 2007).

As fibras de contração rápida são mais sensíveis a redução do pH e o acúmulo de metabólitos intracelulares comparado as fibras lentas e intermediárias. O acúmulo de íons  $\text{H}^+$  e de fosfato inorgânico ( $\text{Pi}$ ) reduzem a velocidade de dissociação do ADP pela MHC, o que reduz a velocidade máxima e a força de contração. Ocorre também redução da sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{++}$  na troponina C, por inibição competitiva com íons  $\text{H}^+$ , reduzindo a produção de força e o pico de potência. A depleção dos estoques de glicogênio muscular promove redução na atividade da SERCA, reduzindo a velocidade máxima de relaxamento, fatores que contribuem para a fadiga muscular (FITTS, 2007; STAMMERS et al., 2015).

#### 1.4 TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico é caracterizado pela repetição de ações com frequência, duração, carga e intensidade (FRONTERA; OCHALA, 2015). Os dois tipos de treinamento que existem são contínuo e intervalado (SHEFER; BENAYAHU, 2012). O treinamento contínuo é realizado em uma intensidade que permita ao executante sustentar a atividade por períodos prolongados, enquanto o treinamento intervalado é realizado em alta intensidade e curta duração, visando o desenvolvimento de fadiga (COFFEY; HAWLEY, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015; HOPPELER, 2016; OGASAWARA et al., 2014).

O músculo esquelético é um tecido altamente adaptável a diferentes tipos de estímulos, sendo capaz de alterar a isoforma e o volume de proteína em resposta a alterações na homeostase celular. O efeito cumulativo de contrações musculares repetitivas, de diversas sessões de treinamento induzem adaptações morfológicas e metabólicas, que são específicas para cada tipo de treinamento (COFFEY; HAWLEY, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015; OGASAWARA et al., 2014).

Durante o exercício físico, os músculos são expostos a diferentes estressores, que rompem a homeostase e ocasionalmente provocam danos estruturais. Os principais estressores fisiológicos durante o treinamento são: carga mecânica, ativação neuronal, ajustes hormonais e distúrbios metabólicos (HOPPELER, 2016).



A cada sessão de treinamento, os músculos são submetidos a uma mistura desses agentes estressores, gatilhos que iniciam vias de sinalização intracelulares, estimulando a replicação de sequências específicas de DNA e, a subsequente transcrição do código genético em uma série de aminoácidos para formar novas proteínas. As consequências funcionais destas adaptações são determinadas por volume, intensidade e duração do treinamento (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016).

A contração muscular gera aumento transitório no volume de RNA mensageiro para múltiplos genes. O pico é geralmente 3–12 horas após o exercício e o retorno a níveis basais ocorre dentro de 24 horas. Sessões frequentes de exercício resultam em aumentos agudos na atividade de transcrição, levando a uma mudança no nível basal de proteínas específicas e a um novo limiar funcional (COFFEY; HAWLEY, 2007).

As respostas adaptativas mais comuns no músculo esquelético submetido cronicamente ao exercício contínuo ou de endurance, são no sentido de aumentar a capacidade metabólica, como aumento na quantidade de capilares nos músculos para aumentar a oferta de  $O_2$  e a remoção de metabólitos, aumento na quantidade e no tamanho de mitocôndrias, principalmente em proximidade ao sarcolema para diminuir a distância de difusão entre as células e os capilares, aumento na concentração de enzimas do ciclo do ácido cítrico para produção aeróbica de ATP, aumento no tamanho do retículo sarcoplasmático e alteração no fenótipo muscular, convertendo fibras de característica glicolítica em fibras de característica oxidativa (COFFEY; HAWLEY, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015).

As respostas adaptativas mais comuns no músculo esquelético submetido cronicamente ao exercício intervalado é o aumento na capacidade de gerar força, principalmente devido à hipertrofia muscular, resultado do aumento no tamanho nas fibras individuais, aumento na adição de miofilamentos, miofibrilas e sarcômeros, resultado da ativação e fusão de células satélite e o consequente aumento do número de mionúcleos na fibra (COFFEY; HAWLEY, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015).

O treinamento de endurance e o treino intervalado de alta intensidade representam fins opostos na adaptação ao treinamento. Como as adaptações aos tipos de estímulos são diferentes, os mecanismos genéticos e moleculares são distintos e cada tipo de estímulo ativa e reprime vias específicas de sinalização



celular e de transcrição e tradução gênica (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016).

A contração muscular é o sinalizador primário para a adaptação ao exercício. A transdução do sinal mecânico associado a outros múltiplos sinais como estresse mecânico, fluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , estado redox e estado de fosforilação ativam vias de sinalização intracelular que controlam a expressão gênica, a síntese de proteínas ou ainda vias de degradação proteica (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016).

## 1.5 TRANSIÇÃO DO REPOUSO PARA O EXERCÍCIO

Logo no início do exercício, o aumento da atividade do músculo esquelético promove compressão das veias, aumentando a velocidade do retorno venoso ao coração. O coração tem a habilidade intrínseca de aumentar a força de contração sistólica em resposta ao aumento do volume ventricular gerado pelo aumento do retorno venoso (KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014).

O aumento do volume ventricular promove a distensão da parede dos ventrículos, provocando aumento na sobreposição dos filamentos contráteis nos sarcômeros gerando aumento na força de contração, fenômeno descrito como lei de Frank Starling do coração (KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014).

O aumento da atividade do sistema nervoso central e periférico são necessários para a manutenção da homeostase. O metaboreflexo muscular ativado pelos metabólitos da contração muscular é o primeiro mecanismo simpato excitatório promovido pelo exercício, estimulando aumento da atividade simpática (NOTARIUS; MILLAR; FLORAS, 2015; PEINADO et al., 2014).

O sistema nervoso central aumenta a atividade eferente para a periferia, promovendo aumento na função cardiovascular, respiratória, glandular e muscular, com a consequente redistribuição de sangue dos tecidos menos ativos para os músculos ativos e assim aumentar a oferta de  $\text{O}_2$  e remover os produtos do metabolismo. Esta resposta é regulada pela formação reticular, tronco encefálico e sistema límbico. O sistema límbico mantém comunicação bidirecional com o sistema nervoso central e, participa na regulação autonômica da resposta (NOTARIUS; MILLAR; FLORAS, 2015; PEINADO et al., 2014).

A concentração plasmática de diversos hormônios se altera. Noradrenalina e adrenalina são secretadas pelos terminais pós-sinápticos do sistema nervoso simpático e pela medula da glândula adrenal. O aumento na eferência simpática leva ao aumento na liberação de catecolaminas na circulação (NOTARIUS; MILLAR; FLORAS, 2015).

O estresse fisiológico gerado pelo exercício é mediado pela secreção de ACTH da adeno hipófise, que atua no córtex da glândula adrenal, promovendo aumento na secreção de cortisol (em humanos) ou corticosterona (em roedores) e DHEA (diidroepiandrosterona) (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; SATO; IEMITSU, 2015).

No pâncreas, as catecolaminas se ligam aos receptores  $\alpha_2$ , estimulando a secreção de glucagon (GROSS et al., 1987) e suprimindo a secreção de insulina (FAGERHOLM; HAAPARANTA; SCHEININ, 2011).

O GH é secretado pela hipófise anterior sobestímulo do hormônio hipotalâmico GHRH. Fatores que estimulam a secreção de GH durante o exercício são redução da glicemia sanguínea e dos estoques de glicogênio muscular e hepático, acidose e aumento na concentração de metabólitos como lactato (HENSELMANS; SCHOENFELD, 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2010).

As catecolaminas, o cortisol e o GH atuam no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, enquanto o glucagon atua somente no fígado e, em sinergia, regulam o metabolismo energético durante o exercício (HASENOUR; BERGLUND; WASSERMAN, 2014; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015; TSILOULIS; WATT, 2015).

## 1.6 MANUTENÇÃO DA DEMANDA ENERGÉTICA DURANTE O EXERCÍCIO

A habilidade de o músculo esquelético manter a produção de ATP durante o exercício físico requer a mobilização de substratos energéticos como carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e metabólitos. Isso é alcançado através da interação entre reguladores neuro-humorais, vias de sinalização intracelular e interação entre proteínas (TSILOULIS; WATT, 2015).

Durante o exercício o tecido adiposo, o fígado e os músculos esqueléticos são alvo de diversos hormônios para atender a demanda energética. Fatores estressantes como mecanotransdução, acidose metabólica, hipóxia, redução da

glicemia sanguínea e dos estoques de glicogênio são o gatilho para a resposta metabólica e a manutenção da homeostase (CAIRNS; BORRANI, 2015; MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015; TSILOULIS; WATT, 2015).

### **1.6.1 Metabolismo hepático durante o exercício**

A demanda metabólica dos músculos esqueléticos durante o exercício não pode ser atendida sem a resposta hepática. Se não fosse o estímulo hormonal e o aumento na liberação de glicose hepática, a hipoglicemia ocorreria rapidamente e a continuidade do exercício seria impossível (TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

A produção de glicose hepática aumenta devido ao aumento nas taxas de glicogenólise e gliconeogênese. No início do exercício, quase todo aumento da produção hepática de glicose é causado pela glicogenólise. Os fatores determinantes para o aumento da atividade hepática durante o exercício são o aumento na secreção de catecolaminas e glucagon, e a redução na secreção de insulina (SUH; PAIK; JACOBS, 2007; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

A glicogenólise ocorre devido à ativação da enzima glicogênio fosforilase e a inibição simultânea da enzima glicogênio sintase, através de uma série de fosforilações iniciadas por hormônios como glucagon e adrenalina. Glicogênio fosforilase fosforila a molécula de glicogênio, liberando glicose 1 fosfato. Glicose 1 fosfato é convertido em glicose 6 fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase. Glicose 6 fosfato segue na via da glicólise até formar piruvato. A contribuição da glicogenólise para o fornecimento de glicose durante o exercício é observada pela redução nos níveis do glicogênio hepático (SUH; PAIK; JACOBS, 2007; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

Existe relação entre o aumento do fornecimento de glicose hepática com os níveis de glicogênio hepático, indicando que a concentração de glicogênio hepático é determinante da taxa de glicogenólise. O treinamento físico promove aumento nos estoques hepáticos de glicogênio e consequentemente, aumentos nas taxas de glicogenólise durante o exercício (SUH; PAIK; JACOBS, 2007).

O aumento da atividade hepática promovido por glucagon e adrenalina reduzem as concentrações de ATP e, aumentam as concentrações de AMP na

célula hepática, o que aumenta a atividade de AMPK. AMPK estimula a atividade de PGC-1 $\alpha$ , fator de transcrição que estimula a atividade de enzimas gliconeogênicas (HASENOUR; BERGLUND; WASSERMAN, 2014).

PGC-1 $\alpha$  atua estimulando a expressão de NRF-1 e -2 (fatores de respiração nuclear 1 e 2). Diversos promotores nucleares e mitocondriais têm sítios de ligação para NRF-1 e -2, incluindo genes que codificam complexos respiratórios, promovendo aumento na oxidação mitocondrial de lipídios (HASENOUR; BERGLUND; WASSERMAN, 2014).

A ativação de AMPK no fígado estimula a  $\beta$  oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias hepáticas, aumentando a utilização de oxigênio e a formação de corpos cetônicos. O aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado gera acúmulo de acetil-CoA e consequente inibição da enzima piruvato desidrogenase. O piruvato é então convertido a oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase, estimulando a via da gliconeogênese (HASENOUR; BERGLUND; WASSERMAN, 2014; NELSON; COX, 2018; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

A gliconeogênese é tão importante quanto a glicogenólise durante o exercício porque converte lactato, glicerol e aminoácidos em glicose, reduzindo a depleção de glicogênio hepático e muscular. A regulação do evento é controlada pela atividade de enzimas unidirecionais como fosfoenol piruvato carboxilase (PEPCK), frutose-1,6-bifosfatase (FP2ase) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) (SUH; PAIK; JACOBS, 2007).

O glicerol, produto da degradação dos triglicerídeos, pode ser convertido em glicose no fígado. A primeira etapa da reação é catalisada pela enzima glicerol cinase, que converte glicerol em glicerol 3 fosfato. A próxima etapa da reação é catalisada pela enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase, que oxida o glicerol 3 fosfato, em diidroxiacetona fosfato, composto intermediário da glicólise, que será convertido a gliceraldeído 3 fosfato pela enzima triose fosfato isomerase e segue na via da gliconeogênese (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

O lactato é produto da oxidação da glicose no músculo esquelético. O lactato é removido da célula muscular para o plasma através de trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e cotransportadores H<sup>+</sup>/Lactato (ARONSON; GIEBISCH, 2011). No fígado o lactato é convertido em piruvato pela enzima lactato desidrogenase. O piruvato segue na via

da gliconeogênese (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Os aminoácidos oriundos do catabolismo do tecido muscular são degradados por reações de desaminação ou transaminação, que resultam na formação de um cetoácido, amônia e uréia. Os cetoácidos são esqueletos carbônicos e podem entrar nas vias de síntese energética. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos alanina, glicina, serina, cisteína, treonina e triptofano, podem ser convertidos em piruvato. O piruvato pode entrar na via da gliconeogênese ou pode ser convertido em acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase e entrar no ciclo do ácido cítrico (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Na via da gliconeogênese, o piruvato é convertido à oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase. O oxaloacetato é convertido a fosfoenolpiruvato pela enzima PEPCK. As reações subsequentes são reversíveis até a formação de frutose-1,6-fosfato. Sob ação da enzima FP2ase, frutose-1,6-fosfato é convertida a frutose 6 fosfato. A próxima reação novamente é reversível até glicose-6-fosfato, que é convertida em glicose pela enzima G6Pase (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

A regulação de PEPCK envolve proteínas e fatores de transcrição como Atrogina-1, HNF-4 (fator nuclear do hepatócito 4) e PPAR $\alpha$  para máxima resposta gliconeogênica. PEPCK, Atrogina-1 e HNF-4 atuam em sinergia, estimulando a transcrição de G6Pase, enzima que na etapa final da gliconeogênese desfosforila glicose 6 fosfato, liberando glicose na circulação (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000).

A transcrição dos genes das enzimas gliconeogênicas é regulada positivamente por glucagon e cortisol, estimulando a atividade enzimática e a gliconeogênese e, regulado negativamente por insulina, suprimindo a atividade e interrompendo o processo (SUH; PAIK; JACOBS, 2007).

### **1.6.2 Metabolismo do tecido adiposo durante o exercício**

Os ácidos graxos são armazenados como triglicerídeos em gotas lipídicas nos adipócitos. Os adipócitos de gordura marrom são envolvidos principalmente em termogênese enquanto os adipócitos de gordura branca são relacionados com o

fornecimento de substrato energético para os tecidos. Os adipócitos de gordura bege têm as duas características (TSILOULIS; WATT, 2015).

A função primária do adipócito é armazenar ácidos graxos durante períodos de abundância energética e liberá-los na circulação para captação e oxidação em outros tecidos durante períodos de privação ou aumento na demanda energética. O processo de remoção e liberação de ácidos graxos do adipócito para a circulação é chamado lipólise (TSILOULIS; WATT, 2015).

Para que a lipólise ocorra é necessária a ativação de lipases e proteínas associadas nos adipócitos, resultando em hidrólise dos triglicerídeos e liberação de ácidos graxos e glicerol na circulação. As principais lipases são lipase adiposa do triglicerídeo (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e lipase monoacilglicerol (MAGL). Cada uma tem afinidade por substratos específicos (TSILOULIS; WATT, 2015).

ATGL apresenta alta afinidade por triglicerídeos e baixa afinidade por diacilglicerol. ATGL pode ser fosforilada por PKA e por AMPK. O produto subsequente da hidrólise do triglicerídeo é diacilglicerol. HSL tem alta afinidade por diacilglicerol e menor afinidade por triglicerídeos. HSL pode ser fosforilada por PKA, AMPK e Erk 1/2 MAPK. A etapa final da lipólise é a hidrólise de diacilglicerol em monoglicerídeo pela enzima MAGL, liberando ácido graxo e produzindo glicerol (TSILOULIS; WATT, 2015).

Perlipina-1 (PLIN1) é localizada na membrana de gotas lipídicas e serve como uma proteína de apoio para as lipases. PLIN1 é fosforilada por PKA e se fragmenta, aumentando a área de superfície da gota lipídica para a ligação da lipase. Sua atividade é necessária para máxima resposta lipolítica (TSILOULIS; WATT, 2015).

O treinamento de endurance resulta em aumento na capacidade da lipólise devido ao aumento na expressão de ATGL, HSL e PLIN1 e também devido à sensibilização dos receptores  $\beta$  (TSILOULIS; WATT, 2015).

Durante exercícios de intensidade moderada (40-50%  $\text{VO}_2$  máx) a taxa de lipólise aumenta duas a três vezes acima de períodos de repouso a partir de trinta minutos de atividade e aumenta progressivamente conforme o exercício se prolonga chegando a picos de cinco vezes acima de períodos de repouso (TSILOULIS; WATT, 2015). Durante exercícios de baixa intensidade (~25%  $\text{VO}_2$  máx) existe aumento de aproximadamente 2,5 vezes comparado ao repouso e não ultrapassa

esses níveis durante exercícios de alta intensidade, embora exista aumento expressivo na ativação simpática, revelando que a lipólise é sensível a aumentos na estimulação  $\beta$  adrenérgica (TSILOULIS; WATT, 2015).

As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são os mais importantes reguladores do metabolismo de ácidos graxos durante o exercício, sendo a adrenalina proveniente da medula adrenal mais proeminente, enquanto a noradrenalina dos neurônios simpáticos atua como coadjuvante. As catecolaminas estimulam a lipólise quando interagem com os receptores  $\beta$  no tecido adiposo (TSILOULIS; WATT, 2015).

Os receptores  $\beta$  são acoplados à proteína Gs. Quando em interação com o ligante, estimulam a atividade de uma enzima, adenilato ciclase. Adenilato ciclase converte ATP em AMP cíclico, promovendo atividade de PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclico), que realiza fosforilações em proteínas específicas, como PLIN1 e ATGL, estimulando a lipólise (TSILOULIS; WATT, 2015).

O cortisol atua no tecido adiposo, no fígado e no músculo esquelético em dois tipos de receptores. As respostas imediatas do cortisol ocorrem via receptores mineralocorticoides acoplados à proteína Gs, estimulando atividade de PKA e as respostas lentas ocorrem via receptores glicocorticoides, que estimulam a transcrição gênica (KORTE et al., 2005; MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015).

O cortisol é regulador do metabolismo lipídico, estimulando a lipólise no tecido adiposo branco, através do estímulo à expressão gênica de ATGL e HSL, liberando na circulação ácidos graxos livres e glicerol. No tecido adiposo marrom, o cortisol estimula a adipogênese pelo aumento na expressão gênica de acyl-CoA carboxilase (ACC) e sintase de ácido graxo (FAS), enzimas envolvidas com a síntese de ácidos graxos (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015).

Fatores como a redução da glicemia sanguínea e dos estoques de glicogênio muscular e hepático, acidose e aumento na concentração de metabólitos como lactato estimulam a secreção de GH (HENSELMANS; SCHOENFELD, 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2010).

Quando o GH se liga no seu receptor, um receptor de tirosina quinase, estimula a atividade de Janus Kinase (JAK). JAK se autofosforila e fosforila transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT). STAT fosforilado se dissocia do receptor e entra no núcleo da célula, onde modula a transcrição de genes alvo (VIJAYAKUMAR et al., 2010).



GH exerce efeito lipolítico principalmente na gordura marrom e menor na gordura branca, pelo estímulo da atividade de HSL e lipoproteína lípase (LPL), que quebra os triglicerídeos circulantes em ácidos graxos livres e estimula a captação pelos tecidos (VIJAYAKUMAR et al., 2010).

GH reprime a captação de glicose pelo tecido adiposo por mecanismos desconhecidos, provavelmente por vias antagônicas as da insulina, inibindo a fosforilação de PI3K e reduzindo a inserção de GLUT1 na membrana (VIJAYAKUMAR et al., 2010).

### **1.6.3 Metabolismo do músculo esquelético durante o exercício**

O músculo esquelético é alvo de hormônios durante o exercício, que modulam o acoplamento excitação contração, a produção de força, a seleção de substratos energéticos e a proteólise muscular (CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014; MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015).

As catecolaminas quando interagem com os receptores  $\beta$  adrenérgicos aumentam o desempenho contrátil dos músculos esqueléticos, promovendo potenciação do pico de força (inotropismo positivo) e aumento na velocidade de relaxamento (lusitropismo positivo) (ANDERSSON et al., 2012; CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014).

Os receptores adrenérgicos dos músculos esquelético,  $\beta_2$ , são acoplados à proteína Gs, que ativa a enzima adenilato ciclase. Adenilato ciclase converte ATP em AMP cíclico, o que torna PKA ativa e, realiza fosforilações em proteínas específicas (CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014).

As catecolaminas podem influenciar o transporte de íons no sarcolema, aumentando a atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. PKA pode fosforilar a proteína fosfolema (FYD1), componente regulatório do complexo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, causando estimulação e aumento da afinidade por  $\text{Na}^+$  intracelular, mas sem aumentar a capacidade máxima de transporte. Esse evento evita o acúmulo de  $\text{K}^+$  extracelular e a redução da excitabilidade da membrana, o que atenua a fadiga (CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014).

A estimulação  $\beta$  adrenérgica pode modular o acoplamento excitação contração, através da fosforilação de canais e proteínas regulatórias, como os



DHPR nos túbulos T, a proteína associada à bomba de  $\text{Ca}^{++}$  do RS, PLB e o canal de  $\text{Ca}^{++}$  do RS, RyR (CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014).

A fosforilação de DHPR pode aumentar o tempo de interação mecânica com o RyR, aumentando o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  durante a despolarização da membrana e também a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  do retículo. A fosforilação de PLB aumenta a atividade de SERCA, aumentando a recaptação de  $\text{Ca}^{++}$  para subsequente liberação por RyR. Eventos associados que aumentam o ciclo do  $\text{Ca}^{++}$ , promovendo efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos (CAIRNS; BORRANI, 2015; HOSTRUP et al., 2014).

A  $\beta$  estimulação aumenta a atividade de diversas enzimas glicolíticas e estimula a utilização de glicogênio e a oxidação de glicose pelo músculo esquelético, o que pode ser benéfico durante a execução de exercícios anaeróbicos supramáximos, porém o efeito desaparece após o desenvolvimento de fadiga (HOSTRUP et al., 2014).

A sinalização exercida pela adrenalina estimula a glicogenólise no músculo esquelético, devido à ativação da enzima glicogênio fosforilase e a inibição simultânea da enzima glicogênio sintase. Glicogênio fosforilase fosforila a molécula de glicogênio, liberando glicose 1 fosfato. Glicose 1 fosfato é convertido em glicose 6 fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase. Glicose 6 fosfato segue na via da glicólise até formar piruvato (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; SUH; PAIK; JACOBS, 2007; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

GH estimula a lipólise do tecido adiposo e a captação de ácidos graxos pelo músculo esquelético, pelo aumento da expressão de LPL. Os ácidos graxos captados podem ser armazenados ou utilizados como substrato energético através da  $\beta$  oxidação. No fígado, a  $\beta$  oxidação aumenta a disponibilidade de corpos cetônicos, reduzindo a necessidade de aminoácidos musculares para a gliconeogênese. Desta maneira GH estimula o metabolismo de proteínas e reprime a proteólise. Esses efeitos são mediados pela sinalização de IGF-1 e mTOR (VIJAYAKUMAR et al., 2010).

Os efeitos catabólicos do cortisol no músculo esquelético são antagônicos aos da insulina, sendo os principais mecanismos a inibição da inserção de GLUT4 na membrana e a supressão da síntese de glicogênio pela inibição de GSK3. GLUT4 e GSK3 são alvos de Akt na via de sinalização da insulina, evento inibido pelo cortisol. O cortisol estimula a expressão de piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4), enzima que inibe a atividade de piruvato quinase e inibe a oxidação de

glicose em acetil-CoA, resultando na redução da utilização de glicose pelos músculos esqueléticos (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015).

O cortisol inibe a via de síntese de proteína mTOR e estimula a via de degradação proteica FoxO, pelo estímulo a expressão de duas ubiquitina ligases, MuRF-1 e Atrogin-1, degradando proteína contrátil e inibindo a miogênese muscular (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015).

## 1.7 NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Como espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem-se espécies derivadas de oxigênio, tanto radicalares como não radicalares. As radicalares são caracterizadas por possuírem elétrons desemparelhados em seu último orbital, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ), moléculas instáveis e reativas. As não radicalares não possuem elétrons desemparelhados, mas também são consideradas ROS, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; MICHAELSON; ILER; WARD, 2013).

Níveis basais de ROS são necessários para a sobrevivência celular, uma vez que participam em importantes vias de sinalização. Por outro lado, excessos podem causar danos oxidativos que podem levar à morte celular (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

No músculo esquelético o principal sítio de formação de ROS ocorre através do vazamento de elétrons dos complexos I e III na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Em níveis basais, é estimado que 0,15% a 2% do consumo total de oxigênio tecidual sejam convertidos em ROS (HOPPELER, 2016; JI, 2015).

Para evitar o acúmulo de ROS e consequentemente aumento de danos oxidativos nas células, as células dispõem de um eficiente sistema antioxidante, que pode ser não enzimático, composto principalmente pelas vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno, coenzima-Q10 e glutatona reduzida (GSH) e, o sistema enzimático, que inclui entre outras, enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona redutase (GR) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Na célula muscular a produção de  $O_2^{\bullet-}$  é controlada diretamente no sítio mitocondrial. A dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  ocorre espontaneamente ou através da

conversão catalítica em  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela ação da enzima SOD, através da reação:  $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido pelas enzimas CAT e GPX (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; KERKSICK; ZUHL, 2014).

A CAT é importante na adaptação ao exercício e no aumento da tolerância ao estresse oxidativo. Esta enzima catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando água e oxigênio, conforme a reação:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (RODRIGUEZ et al., 2004). A GPX é a principal fonte de proteção celular na presença de baixa concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sua atividade depende da GSH que é oxidada em glutatona oxidada (GSSG), através da reação:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$ . Por sua vez, a GR catalisa a reação de redução de GSSG, reciclando GSH com conmitante oxidação do NADPH, através da reação:  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ , possibilitando que GPX continue ativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Porém, durante períodos de estresse celular, (como a hiperglicemia provocada pelo DM, por exemplo) a produção de ROS pode aumentar dramaticamente, tornando-se maior que a capacidade de remoção pelo sistema antioxidante (MICHAELSON; ILER; WARD, 2013). Nesta situação, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o substrato para a formação de um radical extremamente reativo, o  $^{\circ}\text{OH}^{\circ}$ , que ocorre através da reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e um íon de ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ), na reação:  $\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^- + ^{\circ}\text{OH}^{\circ} + \text{Fe}^{3+}$  (JI, 2015; MICHAELSON; ILER; WARD, 2013).

No músculo esquelético, além da cadeia de transporte de elétrons existem outros dois sistemas produtores de ROS, o sistema xantina oxidase (KERKSICK; ZUHL, 2014) e o sistema NADPH oxidase (JI, 2015), ativados durante condições de severa contração muscular, como durante o exercício de alta intensidade, onde a via energética predominante é a glicólise anaeróbica (O'CONNELL; WEIR; MACINTOSH, 2017).

Na via da glicólise anaeróbica, a glicólise é fosforilada no citoplasma da célula muscular pela enzima hexoquinase, formando glicose-6-fosfato (G6P). G6P é decomposta em duas moléculas de piruvato, gerando 2 ATP e 2 NADH (FERRARO et al., 2014; ROSE; RICHTER, 2005). Se o NADH não for reoxidado rapidamente em  $\text{NAD}^+$  pela enzima NADH oxidase (NOX), o prosseguimento da glicólise é impedido (O'CONNELL; WEIR; MACINTOSH, 2017). NOX catalisa a oxidação de NADH com consumo de oxigênio, regenerando  $\text{NAD}^+$  e formando  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através da reação:  $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD} + \text{H}_2\text{O}_2$  (JI, 2015).

Condições de intensa contração muscular ainda ativam o sistema xantina oxidase. Durante contrações musculares repetitivas, o ATP é clivado em ADP e AMP. O AMP é desaminado pela ação da enzima AMP desaminase gerando adenosina e inosina. A enzima purina fosforilase converte inosina em hipoxantina. Hipoxantina é convertida em xantina pela enzima xantina oxidase, formando ácido úrico e  $O_2^{\bullet-}$  (KERKSICK; ZUHL, 2014).

Situações estressantes para o organismo sejam patológicas como o DM, bem como o exercício extenuante, acarreta aumento na produção de ROS pelos músculos, que estimula a atividade de fatores de transcrição como NF $\kappa$ B, MAPK e PGC-1 $\alpha$ , iniciando eventos moleculares que promovem adaptações, como aumento da capacidade antioxidante e da proteção contra dano oxidativo em eventos futuros. Entretanto, a sinalização prolongada ou hypersinalização destas vias promovem aumento da expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que potencializa a produção de ROS, inibe PGC-1 $\alpha$  e ativam processos de proteólise e apoptose, contribuindo para a degradação muscular (GLASS, 2005; HOPPELER, 2016; JI, 2015).

## 1.8 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TREINO INTERVALADO

A principal via energética do treino intervalado de alta intensidade é a glicólise láctica, cuja consequência metabólica é a formação de lactato, redução do pH intracelular e geração de fadiga (SCHOENFELD, 2013).

Imediatamente após o início da contração muscular, a redução dos níveis de ATP e o aumento nos níveis de AMP intracelular estimulam a atividade de AMPK, que fosforila GLUT4 inserindo-o na membrana da célula, permitindo a captação de glicose da corrente sanguínea para o citoplasma da célula, independente da ação da insulina (COFFEY; HAWLEY, 2007; FERRARO et al., 2014; LEE et al., 2015).

Durante a glicólise, a molécula de glicose é decomposta em duas moléculas de piruvato, gerando 2 ATP e 2 NADH (FERRARO et al., 2014; ROSE; RICHTER, 2005). Exercícios realizados com intensidade acima de 60% do  $VO_2$  máximo, o NADH deve ser rapidamente reoxidado em  $NAD^+$  para que a via da glicólise não seja interrompida (O'CONNELL; WEIR; MACINTOSH, 2017). Um processo para a oxidação do NADH e a regeneração do  $NAD^+$  é a redução do piruvato para lactato. O lactato se acumula na célula muscular associado a íons hidrogênio, provocando a

redução do pH intracelular e gerando fadiga (FERRARO et al., 2014; JUEL; HALESTRAP, 1999).

### 1.9 ADAPTAÇÃO AO TREINO INTERVALADO

As principais alterações promovidas pelo treinamento intervalado de alta intensidade são o aumento na área de secção transversa e alteração de recrutamento neural. O aumento na área de secção transversa ocorre quando a taxa de síntese proteica se sobrepõe a taxa de degradação proteica. A resposta hipertrófica à sobrecarga ocorre via aumento no estímulo de vias de sinalização como mTOR, MAPK e vias dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ , que estimulam a síntese de proteínas, adição de mionúcleos às células musculares, aumento do volume de filamentos contráteis e aumento na produção de força (COFFEY; HAWLEY, 2007; SCHOENFELD, 2013).

Certo nível de degradação proteica é necessário para remodelação dos tecidos, porém o treinamento intervalado de alta intensidade reduz a sinalização das vias de atrofia resultando na síntese suplementar de proteínas (COFFEY; HAWLEY, 2007; GLASS, 2005; SANCHEZ et al., 2014).

A intensa contração muscular comprime as artérias e compromete a entrega de oxigênio aos músculos, gerando hipóxia. A hipóxia ativa o fator induzido por hipóxia (HIF-1), principal regulador da homeostase do oxigênio. Os alvos do HIF-1 são os genes da eritropoietina, promovendo eritropoiese, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), promovendo angiogênese e genes de enzimas do metabolismo da glicose, promovendo aumento na atividade da via glicolítica. A exposição à hipóxia promove aumento na tolerância à hipóxia (HOPPELER, 2016; SCHOENFELD, 2013).

Os principais estressores do treino intervalado de alta intensidade são o estresse mecânico e o estresse metabólico. Estes são os gatilhos que ligam vias de sinalização celular e geram adaptação (HOPPELER, 2016; SCHOENFELD, 2013).

O estresse mecânico gerado nos sarcômeros é transferido para a matriz extracelular via adesões focais, onde o citoesqueleto é ligado por proteínas de ligação integrinas à matriz extracelular. O estresse mecânico é responsável por mudanças na atividade da quinase de adesão focal (FAK), responsável pelo turnover dos costâmeros, que são as proteínas que realizam a mecanotransdução. O

estresse mecânico estimula diretamente a via da síntese de proteínas, mTOR (HOPPELER, 2016; SCHOENFELD, 2013).

O estresse metabólico é o resultado do acúmulo de metabólitos no meio intracelular, como lactato, fosfato e íons hidrogênio, reduzindo o pH intracelular e gerando fadiga. O curto intervalo de recuperação entre as séries do exercício intervalado, não permite tempo suficiente para reestabelecer a homeostase, resultando em acúmulo destes metabólitos (HOPPELER, 2016; SCHOENFELD, 2013).

Os mecanismos de ação gerados por estresse metabólico induzido pelo exercício intervalado de alta intensidade que geram adaptações no músculo esquelético são:

### **1.9.1 Ajustes hormonais**

Acidose e acúmulo de metabólitos via estimulação quimiorreflexa, mediado por metaboreceptores intramusculares que fazem aferência a centros superiores, potencializam a secreção de GH pela hipófise. GH estimula a secreção de IGF-1 principalmente no fígado e também nos músculos. O estresse estimula a secreção de cortisol e DHEA (diidroepiandrosterona) pelo córtex das suprarrenais. O cortisol interage com receptores mineralocorticoides, associados à proteína Gs, ativando PKA. Os efeitos imediatos da sinalização do cortisol são similares aos da adrenalina (KORTE et al., 2005). Nos músculos, o DHEA é convertido a testosterona pelas enzimas  $3\beta$  e  $17\beta$  HSD (hidroxiesteróide desidrogenase). A testosterona é então convertida a DHT (diidrotestosterona) pela enzima  $5\alpha$  redutase. Esses hormônios reduzem a proteólise durante o exercício e estimulam o anabolismo no período pós-treino (HENSELMANS; SCHOENFELD, 2014; SATO; IEMITSU, 2015; SCHOENFELD, 2013).

### **1.9.2 Aumento no recrutamento de unidades motoras**

Devido à alta intensidade do treinamento, unidades motoras maiores, contendo fibras rápidas tipo II são recrutadas para sustentar a contração muscular. O estresse metabólico aumenta o recrutamento de unidades motoras maiores. Um grande número de fibras rápidas tipo II é recrutado quando a fadiga é alcançada.

Este é o mecanismo primário pelo qual o treinamento intervalado leva à hipertrofia (COFFEY; HAWLEY, 2007; SCHOENFELD, 2013).

### **1.9.3 Inchaço muscular**

O estresse metabólico resulta cronicamente no aumento dos estoques de glicogênio muscular, que possui carga osmótica e estimula o fluxo de água para dentro da célula muscular. Cada grama de glicogênio atrai três gramas de água. As fibras glicolíticas apresentam altas concentrações de canais de água aquaporina 4, na membrana celular, que permitem o influxo de água (SCHOENFELD, 2013).

As fibras glicolíticas são mais responsivas à hipertrofia porque o aumento na hidratação celular resulta em aumentos da síntese proteica e redução da proteólise. O estímulo mecânico associado ao inchaço celular estimula a proliferação das células satélite (SCHOENFELD, 2013).

## **1.10 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR**

Vias de sinalização importantes para a adaptação ao treinamento intervalado de alta intensidade são a via do IGF-1/mTOR, MAPK e vias dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ , que atuam em sinergismo.

### **1.10.1 Via do IGF-1/mTOR**

A atividade do músculo esquelético e GH estimulam a secreção de IGF-1, que atua como um fator de crescimento. IGF-1 se liga ao receptor de IGF-1 iniciando uma cascata de sinalização. O receptor de IGF-1, receptor de tirosina quinase, quando em interação com o ligante se autofosforila. Fosforila então o substrato do receptor de IGF-1, IRS-1, que fosforila PI3K (inositol 3 fosfato quinase). PI3K fosforila PDK1 (3'fosfoinositídeo dependente de proteína quinase 1). PDK1 fosforila Akt. Akt fosforila outras três proteínas, TSC2 (complexo tuberoso esclerótico 2), GSK3 (glicogênio sintase quinase 3) e FoxO (forkhead box O). Quando fosforiladas essas proteínas são inativas, o que permite a ativação de mTOR (alvo no mamífero da rapamicina). mTOR é o principal gene relacionado com síntese de proteínas e hipertrofia. A síntese de proteínas depende do status nutricional, em particular da



disponibilidade de aminoácidos (BOND, 2016; COFFEY; HAWLEY, 2007; MAJORCZYK; SMOLAŁG, 2016).

### **1.10.2 Via da MAPK**

A família MAPK inclui vias de sinalização distintas no músculo esquelético, cujas principais são ERK-1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) e MAPK p 38. Estas vias são estimuladas por fatores de crescimento, fluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , atividade neural, citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$ , ROS e estresse celular (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

O exercício intervalado de alta intensidade estimula a atividade de MAPK que fosforila fatores de transcrição envolvidos com metabolismo energético, crescimento e remodelação celular e defesa antioxidante (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

MAPK p38 fosforila o fator de transcrição MEF2, envolvido na expressão do gene de GLUT 4, aumentando o transporte de glicose para o músculo durante o exercício e, do fator de miogênese MyoD, estimulando o reparo tecidual (DUMONT et al., 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

MAPK pode estimular a atividade do fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ B que quando ativo, se desloca para o núcleo e desempenha funções regulatórias como aumento na expressão de genes antioxidantes, como SOD e iNOS, reduzindo o estresse oxidativo (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

Lesões celulares geradas pelo exercício, estimulam a atividade do sistema imunológico e a secreção de  $\text{TNF-}\alpha$  por neutrófilos e macrófagos 1 no local da lesão (LAUMONIER; MENETREY, 2016; ZANOU; GAILLY, 2013).  $\text{TNF-}\alpha$  estimula MAPK p38 e NF $\kappa$ B, que estimulam a atividade de Atrogina-1 e MuRF-1, genes de atrofia, contribuindo para proteólise (GLASS, 2005).

Certo nível de inflamação e degradação proteica são necessários para o aumento do turnover proteico muscular, regeneração tecidual e adaptações hipertróficas induzidas pelo exercício (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007; SANCHEZ et al., 2014).

### **1.10.3 Vias dependentes de $\text{Ca}^{++}$**



O aumento do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular que promove as repetidas contrações musculares durante o exercício ativa duas proteínas envolvidas na sinalização dependente de  $\text{Ca}^{++}$ , Cálcio Calmodulina quinase (CaMK) e Calcineurina, uma fosfatase. Calcineurina é envolvida em respostas adaptativas como crescimento e regeneração muscular, atuando em sinergia com IGF-1 para promover proliferação miogênica, diferenciação de células satélite e hipertrofia muscular adaptativa (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016).

As ações de CaMK e Calcineurina ocorrem via NFAT (fator nuclear das células T ativadas) e HDAC (desacetilador nuclear de histona). NFAT desfosforilado entra no núcleo e estimula o fator de transcrição MEF2. HDAC fosforilado é removido do núcleo, e deixa de inibir MEF2, estimulando a expressão gênica (COFFEY; HAWLEY, 2007; DUMONT et al., 2015; RICHTER; HARGREAVES, 2013).

MEF2 é relacionado com a expressão de MHC (miosina de cadeia pesada), que determina o tipo de fibra, GLUT4 e também fatores miogênicos como Myo D e, é influenciado por múltiplos sinalizadores ativados pelo exercício (WACKERHAGE; WOODS, 2002).

MEF2 pode ser ativado por fatores como MRFs (fatores de regeneração miofibrilar) como Myo D e Myf-5, expressos pelas células satélite durante períodos de ativação, proliferação e diferenciação e, estimulam a expressão gênica de MHC rápidas do tipo IIb e IIx, os tipos de fibras mais responsivos à hipertrofia adaptativa (LAUMONIER; MENETREY, 2016; WACKERHAGE; WOODS, 2002; ZANOU; GAILLY, 2013).

O aumento na expressão de GLUT 4 contribui para a captação de glicose e para a estocagem de glicogênio muscular, que gera acúmulo de água na célula e inchaço muscular. O aumento na expressão de MyoD estimula a miogênese e a diferenciação das células satélite em mioblastos (DUMONT et al., 2015; RICHTER; HARGREAVES, 2013; SCHOENFELD, 2013).

## 1.11 MECANISMOS MOLECULARES RELACIONADOS À HIPERTROFIA MUSCULAR

O estresse mecânico pode gerar pequenos cortes e micro lesões nas células musculares, o gatilho para a hipertrofia adaptativa. O músculo esquelético tem a

capacidade de se regenerar, prevenindo a perda de massa muscular. Esta capacidade é devido à presença de células satélite, mononucleadas e presentes no nicho entre o sarcolema da fibra e a lamina basal (LAUMONIER; MENETREY, 2016; ZANOU; GAILLY, 2013).

Em resposta à lesão, as células musculares secretam uma isoforma de IGF-1 chamado de fator de crescimento mecânico (MGF), que estimula a ativação das células satélite no sítio danificado assim como a migração de células satélite de sítios não danificados para o local da lesão (ZANOU; GAILLY, 2013). Além da lesão celular, lesão na MEC libera fatores de crescimento que estimulam a ativação bem como a proliferação das células satélite, como FGF, HGF e IGF-1 (DUMONT et al., 2015).

As células satélite são ativadas, entram em ciclo celular e secretam um fator miogênico, Myf5, que em sinergia com FGF, HGF e IGF-1, promovem sua proliferação. Após a proliferação, uma parte das células satélite permanece quiescente e mantém o pool de células satélite para eventos futuros. Outra parte das células satélite se compromete com a regeneração tecidual e secretam outro fator miogênico, MyoD, que induz a diferenciação em mioblastos (DUMONT et al., 2015; LAUMONIER; MENETREY, 2016; TATSUMI, 2010; ZANOU; GAILLY, 2013). Nesta etapa os mioblastos secretam outro fator miogênico, miogenina (MyoG), que estimula a expressão gênica de miosina de cadeia pesada,  $\alpha$ -actinina, troponina e canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes. MyoG estimula os mioblastos a se agregarem e formem miotubos. Após a formação dos miotubos, é secretado o fator miogênico MRF4 que promove a maturação dos miotubos, organização dos miofilamentos e a migração do núcleo central para a periferia da célula (DUMONT et al., 2015; LAUMONIER; MENETREY, 2016; TATSUMI, 2010; ZANOU; GAILLY, 2013).

A partir desse momento, os miotubos se fundem com miofibras danificadas já maduras. Esta etapa é dependente da regeneração da MEC, aonde os miotubos irão se aderir. Com este processo, novos núcleos se acumulam nas fibras pré-existent, aumentando a síntese proteica, a regeneração e o tamanho do músculo. O músculo esquelético pode se regenerar de pequenos danos. Danos severos geralmente levam à formação de fibrose e perda da função muscular (LAUMONIER; MENETREY, 2016; TATSUMI, 2010; ZANOU; GAILLY, 2013).

### 1.11.1 Regeneração do tecido muscular

O reparo do músculo danificado é dividido em cinco etapas: degeneração, inflamação, regeneração, remodelamento e maturação.

Degeneração e inflamação: O rompimento do sarcolema e do retículo sarcoplasmático levam ao espalhamento de  $\text{Ca}^{++}$ . O excesso de  $\text{Ca}^{++}$  causa a ativação de proteases que contribuem para o dano celular e ativam as células do sistema imunológico (LAUMONIER; MENETREY, 2016).

Após a degeneração, os neutrófilos são as primeiras células a invadir os tecidos lesionados. Os neutrófilos secretam uma grande quantidade de substâncias quimio atrativas, como fatores inflamatórios ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ), fatores de crescimento como fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento da insulina (IGF-1), fator de crescimento vasoendotelial (VEGF), fator de crescimento transformador beta ( $\text{TGF-}\beta$ ), criando um ambiente atraente para outras células inflamatórias, como os macrófagos e monócitos (LAUMONIER; MENETREY, 2016; ZANOU; GAILLY, 2013).

Regeneração: A chave para o processo de cura e regeneração tecidual é a infiltração dos macrófagos. São identificados dois tipos de macrófagos, os tipo M1 e os tipo M2. Os macrófagos M1 são inflamatórios, atuam nas primeiras 24 horas após a lesão e contribuem para a lise celular, promovem fagocitose dos restos celulares, secretam citocinas pró-inflamatórias como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  e também estimulam a proliferação e a diferenciação das células satélite em mioblastos. Os macrófagos M2 são anti-inflamatórios, atuam após 48 horas da lesão e interrompem a inflamação através da secreção de  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-10}$  e  $\text{IGF-1}$ , estimulam a atividade de metaloproteases (MMPs), inibindo fibrose tecidual, secretam precursores miogênicos de proliferação, crescimento, diferenciação e estimulam a formação de miotubos (LAUMONIER; MENETREY, 2016; ZANOU; GAILLY, 2013).

Remodelamento: Para a formação dos miotubos é necessário a adesão dos mioblastos, uns nos outros, mediado pelas proteínas de adesão integrinas. Este evento ocorre na MEC e, portanto dependem da remodelação da matriz, que provê estabilidade mecânica para as fibras, vasos e nervos.  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{TGF-}\beta$  secretados durante o período de inflamação e a atividade de macrófagos tipo M1, promovem estímulo para a síntese de MEC (colágeno I e III, laminina e fibronectina) pelos fibroblastos, que residem no espaço intersticial entre as fibras musculares. Na fase

inicial a fibrose é benéfica, estabiliza o tecido e serve como alicerce para a regeneração das miofibrilas (CHAPMAN; MEZA; LIEBER, 2016; LAUMONIER; MENETREY, 2016).

A infiltração e atividade dos macrófagos tipo M2, inibem a inflamação, inibem a síntese adicional de matriz extracelular e estimulam a atividade das MMPs 2 e 9, que clivam componentes da MEC, inibindo a formação de fibrose. Enquanto as MMPs degradam o excesso de MEC ocorre a liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento vaso endotelial (VEGF), que estimula a angiogênese e o crescimento vascular, fator de crescimento do nervo (NGF), que estimula a reinervação e a formação de placa motora nas novas células musculares e de fator de crescimento da insulina (IGF-1), que estimula a síntese proteica e o reparo tecidual (ALAMEDDINE; MORGAN, 2016; LAUMONIER; MENETREY, 2016; SNYMAN; NIESLER, 2015).

**Maturação:** Os miotubos formados precisam maturar para que se tornem funcionais. A via de sinalização Akt/mTOR, estimulado por IGF-1, tem papel importante na maturação dos miotubos, estimulando a síntese proteica, desenvolvendo a maquinaria metabólica, contrátil e um eficiente acoplamento excitação contração na célula (DUMONT et al., 2015; LAUMONIER; MENETREY, 2016).

A lesão além de danificar células, rompe vasos e capilares, gerando hipóxia no tecido. A revascularização e o aporte sanguíneo são os primeiros sinais de regeneração. Sem revascularização ocorre formação de fibrose e perda de função muscular. A liberação de VEGF da MEC durante o período de clivagem por MMPs favorece a angiogênese (ALAMEDDINE; MORGAN, 2016; LAUMONIER; MENETREY, 2016).

O reparo é completo quando a fibra danificada é regenerada e reinervada. O contato sináptico entre o neurônio motor e o músculo é reestabelecido, estimulado por NGF liberado da MEC durante o período de clivagem por MMPs (LAUMONIER; MENETREY, 2016).

## 1.12 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TREINO DE ENDURANCE

A principal via energética do treino de endurance é a fosforilação oxidativa, cujos principais substratos são glicose, ácidos graxos, corpos cetônicos e, em menor

proporção, aminoácidos, para sintetizar ATP de forma oxigênio dependente. O principal desafio para a homeostase é a manutenção do fornecimento de substratos energéticos para a prolongada contração muscular (HOPPELER, 2016).

A ação hormonal e a contração muscular durante o exercício promovem a ativação de vias de sinalização celular no tecido adiposo, no fígado e nos músculos, iniciando uma série de eventos catabólicos para a manutenção da síntese de ATP (COFFEY; HAWLEY, 2007; LEE et al., 2015; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

### **1.12.1 Catabolismo da glicose**

Processo iniciado com a glicólise anaeróbia no citoplasma das células. Cada molécula de glicose gera dois piruvatos, dois ATPs e dois NADH. Cada piruvato é convertido em acetil-CoA pela ação da enzima piruvato desidrogenase, gerando um  $\text{CO}_2$  e um NADH. Os acetil-CoA serão oxidados no ciclo do ácido cítrico. NADH transporta os elétrons provenientes da glicólise para a cadeia de transporte de elétrons (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

### **1.12.2 Catabolismo dos lipídios**

Processo iniciado com a lipólise no tecido adiposo, processo hormônio dependente onde os triglicerídeos serão degradados por lipases, separando os ácidos graxos do glicerol e liberando-os na circulação. O destino do glicerol é a glicólise ou a gliconeogênese no fígado. Os ácidos graxos são transportados na circulação ligados à albumina, até serem captados pelos músculos ou fígado (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018; TSILOULIS; WATT, 2015).

No citoplasma das células muscular e hepática, na membrana mitocondrial externa, os ácidos graxos são unidos à coenzima A pela ação da enzima acil-CoA sintetase ao custo de um ATP, formando a molécula de acil-CoA graxo. Um dos destinos do acil-CoA graxo é o interior da mitocôndria para oxidação. Para que o processo ocorra, o acil-CoA graxo se liga de forma transitória à molécula da carnitina, a coenzima A é removida e forma-se a molécula acil-carnitina, reação

catalisada pela enzima carnitina acil transferase I (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

A molécula acil-carnitina cruza a membrana externa da mitocôndria através de poros e cruza a membrana interna por difusão facilitada através do transportador acil-carnitina/ carnitina. Na matriz mitocondrial o grupo acil é transferido da carnitina para a coenzima A pela ação da enzima acil transferase II, regenerando o acil-CoA graxo. Na matriz mitocondrial o acil-CoA graxo será oxidado por enzimas num processo denominado  $\beta$  oxidação (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

O acil-CoA graxo sofrerá remoção oxidativa do segundo carbono (ou carbono  $\beta$ ), formando uma molécula de acetil-CoA e gerando um NADH e um  $\text{FADH}_2$ . Como os ácidos graxos são moléculas de cadeia carbônica longa, cada volta na  $\beta$  oxidação remove oxidativamente dois carbonos, forma um acetil-CoA e gera um NADH e um  $\text{FADH}_2$  (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Os acetil-CoA formados na  $\beta$  oxidação serão oxidados no ciclo do ácido cítrico. NADH e  $\text{FADH}_2$  transportam os elétrons provenientes da  $\beta$  oxidação para a cadeia de transporte de elétrons (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

No fígado, a persistente  $\beta$  oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias hepáticas geram acúmulo de acetil-CoA e consequente inibição da enzima piruvato desidrogenase. O piruvato é convertido a oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase, desviando-o para a via da gliconeogênese, reduzindo a entrada do acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico, que é desviado para a cetogênese (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015).

Na cetogênese, a ação da enzima tiolase condensa dois acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, molécula de quatro carbonos. A enzima HMG-CoA sintase condensa um acetoacetil-CoA a outro acetil-CoA, formando HMG-CoA, molécula de seis carbonos. Na próxima etapa, a enzima HMG-CoA liase quebra o HMG-CoA em duas moléculas, uma de quatro carbonos, o acetoacetato e outra de dois carbonos, o acetil-CoA (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

O acetoacetato é aceptor de elétrons do NADH, que precisa ser oxidado para regenerar  $\text{NAD}^+$ , evitando que a  $\beta$  oxidação hepática seja interrompida. A ação da enzima  $\beta$  hidroxibutirato desidrogenase permite que cada acetoacetato aceite dois elétrons e seja reduzido a  $\beta$  hidroxibutirato (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Os corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$  hidroxibutirato, moléculas solúveis, são exportados pela circulação para tecidos como músculo esquelético e coração onde serão oxidados (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Nas mitocôndrias dos músculos, acetoacetato e  $\beta$  hidroxibutirato são oxidados. A enzima  $\beta$  hidroxiacetato desidrogenase oxida o  $\beta$  hidroxibutirato a acetoacetato, formando um NADH. A atividade da enzima  $\beta$  cetoacil-CoA transferase permite ao acetoacetato receber uma coenzima A do succinil-CoA, intermediário do ciclo do ácido cítrico, formando acetoacetil-CoA. O acetoacetil-CoA é clivado pela enzima tiolase, gerando dois acetil-CoA, que serão oxidados no ciclo do ácido cítrico. NADH transporta os elétrons provenientes da oxidação do  $\beta$  hidroxibutirato para a cadeia de transporte de elétrons (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

### **1.12.3 Catabolismo dos aminoácidos**

Os aminoácidos contribuem com menos de 5% da provisão energética durante o exercício físico. O processo inicia com a proteólise do tecido muscular pelas vias da ubiquitina/proteossomo e autofagia/lisossomo (LEE et al., 2015).

A degradação das proteínas contráteis e estruturais do sarcômero ocorre pela via da Ubiquitina/Proteassomo. Ubiquitinas selecionam substratos proteicos para ubiquitinação e degradação no Proteassomo. MuRF-1, gene da via da Ubiquitina/Proteassomo, envolvido com a degradação de miofilamentos. MuRF-1 seleciona miosina de cadeia pesada (MHC) e titina. Outro MuRF, TRIM32, seleciona filamentos finos como actina e tropomiosina. Após a ubiquitinação, as proteínas são degradadas no Proteassomo (BOND, 2016; RUSSELL, 2010; SANCHEZ et al., 2014).



Outro gene da via Ubiquitina/Proteassomo é MAFbx/Atrogina-1, envolvido com a ubiquitinização de fatores estimuladores da miogênese, como Myo D, Myo G e calcineurina (BOND, 2016; GLASS, 2005; SANCHEZ et al., 2014).

A via da Autofagia promove degradação proteica de organelas disfuncionais no lisossomo. O processo autofágico inicia com a captura de substratos por vesículas chamadas autofagossomos. A vesícula se funde com o lisossomo, formando o autolisossomo. O material capturado é digerido por hidrolases lisossomais (SANCHEZ et al., 2014).

A maquinaria autofágica necessita de proteínas ATG para biogênese do autofagossomo e maturação do sistema enzimático, cuja transcrição é regulada por Atrogina-1 (SANCHEZ et al., 2014).

A autofagia e a proteólise são importantes para a integridade celular e a adaptação ao exercício, sendo deletérias quando em excesso (COFFEY; HAWLEY, 2007; SANCHEZ et al., 2014). O aumento da degradação proteica durante o exercício torna os aminoácidos disponíveis para utilização como substrato energético além de aumentar a disponibilidade de aminoácidos para a transcrição de diversos genes induzidos durante a realização do exercício, como por exemplo, a remodelação mitocondrial (SANCHEZ et al., 2014).

Para a utilização como substrato energético, no fígado, os aminoácidos sofrerão processos de desaminação e transaminação, sendo convertidos em substratos intermediários do ciclo do ácido cítrico, em piruvato ou em acetil-CoA (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos triptofano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina e treonina produzem acetil-CoA, enquanto os esqueletos carbônicos dos aminoácidos alanina, glicina, serina, cisteína, treonina e triptofano, podem ser convertidos em piruvato. O piruvato pode entrar na via da gliconeogênese ou pode ser convertido em acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, gerando um  $\text{CO}_2$  e um NADH. Os acetil-CoA formados a partir dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos serão oxidados no ciclo do ácido cítrico. NADH transporta os elétrons provenientes da conversão de piruvato em acetil-CoA para a cadeia de transporte de elétrons (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

#### **1.12.4 Ciclo do ácido cítrico**



A função do ciclo do ácido cítrico é oxidar o acetil-CoA oriundo do catabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas em  $\text{CO}_2$  (dióxido de carbono) e as coenzimas reduzidas NADH e  $\text{FADH}_2$ . Por sua vez, estas coenzimas serão oxidadas na cadeia respiratória mitocondrial, resultando na síntese de ATP, um processo denominado fosforilação oxidativa (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

A cadeia de transporte de elétrons é localizada na membrana interna mitocondrial e é formada por cinco complexos proteicos. São eles: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo c oxidoreductase (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V) (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018). Os elétrons do NADH e do  $\text{FADH}_2$ , produzidos durante os processos metabólicos, são transferidos para os complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente. Durante o transporte desses elétrons até o oxigênio, ocorre o bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV da cadeia respiratória, resultando na força próton-motora ( $\Delta p$ ). Por sua vez a força próton-motora impulsiona os prótons de volta para a matriz mitocondrial através do fator  $F_o$  da ATP sintase (complexo V), possibilitando a liberação de ATP na matriz mitocondrial (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; NELSON; COX, 2018).

### 1.13 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Durante o exercício de endurance, o aumento na razão AMP/ATP, elevado fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  e aumentos na produção de ROS são os principais fatores que estimulam vias de sinalização intracelular (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; LEE et al., 2015).

#### 1.13.1 Via da AMPK

A contração muscular promove redução dos níveis de ATP e aumento dos níveis de AMP intracelular, fator que ativa o sensor de privação energética AMPK. AMPK realiza fosforilações em proteínas específicas como GLUT4, estimulando a captação de glicose independente de insulina, FoxO, gene que regula os

mecanismos de transcrição responsáveis pela degradação proteica pela via, Ubiquitina/Proteassomo e degradação de organelas disfuncionais pela via Autofagia/Lisossomo (GLASS, 2005; SANCHEZ et al., 2014), estimulando a mobilização de aminoácidos e aumenta a transcrição e atividade de PGC-1 $\alpha$ , estimulando a biogênese de mitocôndrias e a oxidação de ácidos graxos, estimulando a mobilização de substratos energéticos a fim de manter a síntese de ATP e estender a duração do exercício (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; LEE et al., 2015).

### **1.13.2 Vias dependentes de Ca<sup>++</sup>**

Os prolongados períodos em que o Ca<sup>++</sup> intracelular permanece elevado, estimula a atividade de duas proteínas envolvidas na sinalização dependente de Ca<sup>++</sup>, Cálcio Calmodulina quinase (CaMK) II e IV e, Calcineurina, uma fosfatase, cujas funções são relacionadas com fosforilação e ativação de PGC-1 $\alpha$ , estimulando a biogênese mitocondrial, desfosforilação de NFAT (fator nuclear das células T ativadas) e fosforilação de HDAC (desacetilador nuclear de histona), estimulando expressão de MHC e a conversão do tipo de fibra, fatores miogênicos e GLUT4 (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016; WACKERHAGE; WOODS, 2002).

### **1.13.3 Via da MAPK**

A família MAPK inclui vias de sinalização distintas no músculo esquelético, cujas principais são ERK-1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) e MAPK p38. Estas vias são estimuladas por fatores de crescimento, fluxo de Ca<sup>++</sup>, atividade neural, citocinas como TNF- $\alpha$ , ROS e estresse celular (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

O exercício de endurance estimula a atividade de MAPK que fosforila fatores de transcrição envolvidos com metabolismo energético, remodelação celular e defesa antioxidante (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

MAPK p38 fosforila o fator de transcrição MEF2, envolvido na expressão de MHC e conversão do tipo de fibra e de GLUT 4, aumentando o transporte de glicose para o músculo durante o exercício. Fosforila também PGC-1 $\alpha$ , participando do

processo de biogênese mitocondrial (DUMONT et al., 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007; YAN et al., 2011).

ERK-1/2 através da proteína de ligação de ácido graxo CD36, regula a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e fosforila a enzima lipase hormônio sensível (HSL), estimulando a captação e oxidação de ácidos graxos pelos músculos (DUMONT et al., 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

#### 1.14 ADAPTAÇÃO AO TREINO DE ENDURANCE

O treinamento de endurance envolve o recrutamento de grandes grupamentos musculares em uma intensidade que permita o indivíduo sustentar a atividade por períodos prolongados. A maquinaria genética do músculo esquelético promove adaptações fenotípicas para atender a extenuante demanda imposta (COFFEY; HAWLEY, 2007; SANCHEZ et al., 2014).

As adaptações mais comuns são alterações no recrutamento neural, melhoria na cinética de remoção do lactato, aumento na expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de gordura, como lipoproteína lipase (LPL) e carnitina acil transferase, alteração na morfologia do músculo esquelético com conversão de fibras rápidas em fibras lentas com consequente aumento na capacidade oxidativa e resistência à fadiga, aumento do suprimento sanguíneo capilar para os músculos, aumentando a perfusão tecidual e a remoção de metabólitos, aumento no número e tamanho das mitocôndrias, principalmente em proximidade com o sarcolema, aumento nas concentrações das enzimas do ciclo do ácido cítrico, para produção aeróbica de ATP, redução na área de secção transversa muscular para reduzir a distância de difusão de gases, substratos e metabólitos, retículo sarcoplasmático mais desenvolvido com redução de proteínas relacionadas com recaptção de  $\text{Ca}^{++}$ , como SERCA, sugerindo aumento na eficiência muscular (COFFEY; HAWLEY, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015; JI, 2015; SANCHEZ et al., 2014; YAN et al., 2011).

##### 1.14.1 Aumento na produção de ROS

O aumento na produção de ROS pelos músculos durante o exercício de endurance estimula a atividade da via de sinalização MAPK e, pode estimular a

atividade do fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ B que quando ativo, se desloca para o núcleo e desempenha funções regulatórias como aumento na expressão de genes antioxidantes, como SOD e iNOS, aumentando a defesa antioxidante e estimulando a atividade de Atrogina-1 e MuRF-1, genes de atrofia, contribuindo para proteólise (GLASS, 2005; JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

Certo nível de degradação proteica é necessário para redução na área de secção transversa muscular, reduzindo a distância de difusão de gases, substratos e metabólitos, contribuindo para a adaptação ao treinamento de endurance (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007; SANCHEZ et al., 2014).

#### **1.14.2 Flexibilidade metabólica**

O aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres promovidos pelo exercício de endurance estimula a atividade do fator de transcrição PPAR (receptor de proliferação de peroxissomo). PPAR $\delta$  é expresso no músculo esquelético, principalmente nas fibras oxidativas. Os ácidos graxos de cadeia longa agem como ligantes nos fatores de transcrição PPAR, que aumentam a dependência dos músculos por ácidos graxos durante os exercícios de longa duração ou durante o jejum, induzindo um de seus genes alvo, a piruvato desidrogenase kinase (PDK4) a inativar a piruvato desidrogenase, suprimindo a utilização de glicose pelos músculos (HOPPELER, 2016). Sua ativação é considerada primária para aumentar a utilização de ácidos graxos pelos músculos (KIM; PARK, 2015; NAKAMURA; YUDELL; LOOR, 2014). É demonstrado aumento da expressão de PPAR $\delta$  no músculo esquelético após exercício de endurance ou ainda estimulado por ácidos graxos livres (KANNISTO et al., 2006).

#### **1.14.3 Biogênese mitocondrial**

As vias de sinalização celular AMPK, CaMK e MAPK p38 estimulam a expressão e a transcrição de PGC-1 $\alpha$ , regulador da biogênese mitocondrial (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; LEE et al., 2015; WACKERHAGE; WOODS, 2002).

PGC-1 $\alpha$  é principalmente encontrado nas fibras vermelhas do tipo I e estimula a expressão de fatores de transcrição de genes de proteínas mitocondriais,

como por exemplo, NRF-1 e NRF-2 (fator de respiração nuclear), Tfam (fator de transcrição mitocondrial) que estimula a transcrição de DNA mitocondrial e PPAR que regula a expressão de genes relacionados com oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015; WACKERHAGE; WOODS, 2002).

Depois de ativados, PPAR, NRF-1 e NRF-2 podem estimular PGC-1 $\alpha$ , aumentando sua expressão. O aumento na expressão de PGC-1 $\alpha$  estimulam ainda mais PPAR, NRF-1 e NRF-2 resultando em biogênese mitocondrial e estimulando a conversão de fibras glicolíticas em fibras oxidativas (COFFEY; HAWLEY, 2007; LIN et al., 2002; NAKAMURA; YUDELL; LOOR, 2014; WANG et al., 2004).

#### **1.14.4 Conversão dos tipos de fibra muscular**

As ações de CaMK e Calcineurina ocorrem via NFAT (fator nuclear das células T ativadas) e HDAC (desacetilador nuclear de histona). NFAT desfosforilado entra no núcleo e estimula o fator de transcrição MEF2. HDAC fosforilado é removido do núcleo, e deixa de inibir MEF2, estimulando a expressão gênica (COFFEY; HAWLEY, 2007; DUMONT et al., 2015; RICHTER; HARGREAVES, 2013).

MEF2 é influenciado por múltiplos sinalizadores ativados pelo exercício de endurance como calcineurina, estimulada por fluxo de Ca<sup>++</sup>, que estimula a expressão de MHCs intermediárias do tipo IIa e Erk 1/2 estimulado por ROS, que estimula a expressão de MHC lenta tipo I (HOPPELER, 2016; JI, 2015; LAUMONIER; MENETREY, 2016; WACKERHAGE; WOODS, 2002; ZANOU; GAILLY, 2013).

De forma crônica e de acordo com o turnover proteico muscular, o exercício de endurance estimula o aumento na síntese de MHC tipo I e tipo IIa e reduz o estímulo a síntese de MHC tipo IIb e IIx, alterando o fenótipo muscular, tornando o músculo mais oxidativo e resistente à fadiga (YAN et al., 2011).

#### **1.14.5 Angiogênese**

O aumento da necessidade metabólica dos músculos nem sempre pode ser atendido apenas pelo aumento no débito cardíaco (YAN et al., 2011).

Durante o exercício de endurance o músculo é submetido a estresse mecânico, estresse oxidativo, aumento da sinalização  $\beta$  adrenérgica, déficit de ATP, aumento no fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  e déficit de oxigênio que resulta em hipóxia. Esses fatores ativam sinalizadores intracelulares como p38 MAPK, PKA, AMPK, CaMK e HIF-1 (fator induzido por hipóxia), que podem fosforilar e ativar o fator de transcrição PGC-1 $\alpha$  (CHINSOMBOON et al., 2009; YAN et al., 2011).

PGC-1 $\alpha$  é tido como principal regulador da angiogênese em diversos tecidos. PGC-1 $\alpha$  atua através de ERR $\alpha$  (receptor  $\alpha$  relacionado a estrogênio), que estimula a expressão de VEGF (fator de crescimento vaso endotelial) pelas células musculares (CHINSOMBOON et al., 2009; YAN et al., 2011).

VEGF atua de forma autócrina e parácrina, estimulando o aumento do calibre dos vasos, bem como a síntese de novos capilares nas fibras. A expansão da rede capilar ocorre primariamente através da divisão longitudinal dos capilares existentes, separando e dividindo as células endoteliais e gerando novos capilares o que permite o aumento da perfusão tecidual e da capacidade metabólica dos músculos (CHINSOMBOON et al., 2009; HOPPELER, 2016; YAN et al., 2011).

## 1.15 JUSTIFICATIVA

A combinação de fatores como baixa conscientização da população geral e início de doença silencioso, faz com que os casos de DM continuem aumentando. Se as tendências atuais persistirem, o número de diabéticos no mundo em 2040 será superior a 642 milhões de pessoas (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

Complicações do DM como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, insuficiência renal, cegueira e amputações de membros periféricos, fazem com que o DM seja associado a enormes taxas de internações hospitalares, impactando a qualidade de vida dos pacientes, além de gerar elevados custos financeiros para os sistemas de saúde de todos os países.

Pacientes portadores de DM com baixo controle glicêmico podem apresentar disfunção do músculo diafragma e redução da capacidade respiratória (VAN LUNTEREN; MOYER, 2009; WANKE et al., 1991). Uma alternativa de baixo custo para melhorar os marcadores de saúde da população é a prática regular de exercícios físicos.

As repetidas contrações musculares durante o exercício ativam vias de sinalização celular envolvidas com captação de glicose na ausência de insulina (COFFEY; HAWLEY, 2007), estímulo à síntese de enzimas antioxidantes (JI, 2015), aumentando a defesa antioxidante, reduzindo a proteólise muscular e ainda aumento do turnover proteico de músculos e mitocôndrias (LAKER et al., 2017), renovando com maior frequência as células e organelas, preservando a função dos tecidos. Em pacientes diabéticos, a prática regular de exercícios físicos reduz a hiperglicemia e melhora o perfil lipídico, podendo prevenir ou retardar as consequências da doença (MUSI; YU; GOODYEAR, 2003).

Entretanto, pouco é sabido sobre a adaptação do músculo esquelético, especialmente do músculo diafragma, de pacientes diabéticos ao treinamento, ou ainda qual o programa de treinamento mais adequado para esta população obter os benefícios esperados, o que justifica a necessidade do estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as respostas adaptativas após seis semanas de treinamento de endurance ou treinamento intervalado sobre parâmetros da função muscular, mitocondrial e de estresse oxidativo em diafragma de ratos diabéticos e, determinar qual modalidade de treinamento é mais adequado para esta população.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1- Avaliar *in vitro* produção de força durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ), velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ), velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ), força tetânica máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) e resistência à fadiga.

2- Avaliar a eficiência da atividade mitocondrial por meio de parâmetros respiratórios como velocidade de fluxo de oxigênio.

3- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como concentração total de ROS, taxa de peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Cinquenta e sete ratos Wistar machos, pesando entre 250-300 g foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e comida. O Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná aprovou todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo (CEEAA-971). Os animais foram separados em grupo controle (GC, n=29) e grupo *diabetes* (GD, n=28). Foram então subdivididos em grupo controle sedentário (CS, n=10), grupo *diabetes* sedentário (DS, n=8), grupo controle treinamento de endurance (CE, n=9), grupo *diabetes* treinamento de endurance (DE, n=10), grupo controle treinamento intervalado (CI, n=10) e grupo *diabetes* treinamento intervalado (DI, n=10). Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (50 mg kg<sup>-1</sup>) e xilazina (20 mg kg<sup>-1</sup>) e, na ausência de resposta a estímulos dolorosos, os protocolos de indução de DM e controle foram realizados.

#### 3.2 INDUÇÃO DE DM

Conforme descrito por Salvi *et al.*, 2010, o DM foi induzido por uma injeção intravenosa peniana de STZ (50mg kg<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich) dissolvida em 0,01M de tampão citrato, pH 4,5. Nos grupos controle apenas tampão citrato foi injetado. Os animais foram mantidos em jejum de 14 horas anteriormente às injeções. Sete dias após a indução, a glicemia sanguínea em jejum foi mensurada através de um glicosímetro (Accutrend, Roche), de uma gota de sangue da cauda dos animais, para garantir que os animais se tornaram diabéticos (concentração de glicose sanguínea > 250 mg dL<sup>-1</sup>). 24 horas após o diagnóstico de DM, as sessões de treinamento começaram.

#### 3.3 PROTOCOLOS DE NATAÇÃO FORÇADA

A natação foi realizada em baldes (30 x 30 x 70 cm) cheios com 50 cm de água a  $32 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . As cargas foram presas às caudas dos animais.

O protocolo de treinamento de endurance foi adaptado de Guerreiro *et al.*, 2016. Os animais nadaram cinco vezes por semana por seis semanas. Nos primeiros dois dias de treinamento, os animais foram adaptados à água, nadando 30 minutos por dia sem carga. Nas próximas oito sessões, nadaram 30 minutos por dia com carga equivalente a 3% do peso corporal. Nas próximas cinco sessões, os animais nadaram por 35 minutos por dia com carga equivalente a 5% do peso corporal. Finalmente nas últimas 15 sessões os animais nadaram por 45 minutos com carga equivalente a 5% do peso corporal.

O protocolo de treinamento intervalado foi adaptado de Oh *et al.*, 2016. Os animais nadaram cinco vezes por semana por seis semanas dentro de tubos plásticos (15 x 15 x 80 cm), que eram imersos nos baldes cheios de água, forçando os animais a nadar e então removidos dos baldes, permitindo recuperação. Os animais realizaram em todas as sessões 14 séries de 20 segundos com 10 segundos de intervalo entre as séries, totalizando 7 minutos de treino a cada sessão. Nos primeiros dois dias de treinamento os animais foram adaptados à água e nadaram sem carga. Nas oito sessões seguintes, os animais nadaram com carga equivalente a 7% do peso corporal. Nas cinco próximas sessões, nadaram com equivalente a 12% do peso corporal. Finalmente nas últimas 15 sessões, a natação foi realizada com equivalente a 15% do peso corporal.

Os animais dos grupos sedentários permaneceram dentro das gaiolas por seis semanas. Todos os animais foram pesados semanalmente para o ajuste das cargas. Após a última sessão de treinamento, os animais permaneceram por 48 horas dentro das gaiolas para descanso. Ao final do período, a glicemia sanguínea foi checada novamente, os animais foram anestesiados e eutanasiados por exsanguinação, os diafragmas foram coletados e os experimentos realizados.

### 3.4 ORGANIZAÇÃO DAS SESSÕES DE TREINAMENTO E DOS EXPERIMENTOS

Os treinamentos foram realizados em três etapas. Na primeira etapa, foram 20 animais, sendo seis sedentários (três CS e três DS), seis submetidos ao treino de endurance (três CE e três DE) e oito submetidos ao treino intervalado (quatro CI e quatro DI). No primeiro dia, treinaram dois animais CE e dois animais CI. No

segundo dia, além dos quatro animais do primeiro dia, treinaram dois animais DE e dois animais DI. No terceiro dia, além dos oito animais que já treinavam, treinaram um animal CE e dois CI. Finalmente no quarto dia, além dos onze animais que já treinavam, treinaram um animal DE e dois animais DI. Ao completar cinco sessões consecutivas de treinamento, os animais descansavam por dois dias seguidos. Após, iniciavam a segunda semana de treinamento e assim por diante até o final da trigésima sessão.

Os experimentos eram realizados conforme os animais terminavam as sessões de treinamento, em quatro dias consecutivos, sendo cinco animais por dia, na seguinte disposição: Primeiro dia de experimento: dois animais CE, dois animais CI e um animal CS. Segundo dia de experimento: dois animais DE, dois animais DI e um animal DS. Terceiro dia de experimento: um animal CE, dois animais CI e dois animais CS. Quarto dia de experimento: um animal DE, dois animais DI e dois animais DS. Os diafragmas após serem removidos eram dissecados e divididos em duas partes. Uma parte foi utilizada nos experimentos de contratilidade enquanto as outras partes utilizadas nos experimentos de respiração mitocondrial ou de estresse oxidativo.

Na segunda etapa, 20 animais, sendo seis sedentários (três controles e três DM), oito submetidos ao treino de endurance (quatro controles e quatro DM) e seis submetidos ao treino intervalado (três controles e três DM). Nesta etapa, dois animais do grupo DM endurance e um animal do grupo controle endurance se afogaram. Na terceira e última etapa, 20 animais, sendo seis sedentários (quatro controles e dois DM), oito submetidos ao treino de endurance (três controles e cinco DM) e seis submetidos ao treino intervalado (três controles e três DM). A organização das sessões de treinamento, dos dias de experimento e da utilização dos músculos foram realizados conforme descrito na primeira etapa.

### 3.5 PARÂMETROS CONTRÁTEIS DE MÚSCULO DIAFRAGMA *IN VITRO*

Os músculos foram removidos, dissecados e mantidos em solução de Ringer com a seguinte composição: NaCl 110mM, KCl 4mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, TRIZMA 10mM e glicose 11mM, pH calibrado em 7.4 com NaOH ou HCl, gaseificados com oxigênio puro e mantidos a 37°C.

Conforme descrito por Ferreira *et al.*, 2010, a porção costal foi fixada a um clip fixo enquanto a porção tendínea foi fixada a um transdutor de força (Fort 10 WPI, Transduction Laboratories Co.), para mensurar contrações em condições isométricas. Os músculos foram estirados através de um micro manipulador acoplado ao clip fixo até o comprimento ideal da fibra, onde a produção de força era máxima. A estimulação elétrica foi realizada através de dois eletrodos de platina posicionados ao longo dos músculos na câmara de banho, onde os mesmos permaneceram imersos em solução de Ringer. Estímulos elétricos de voltagem supralimiar (24V) com duração de um milissegundo e frequência padrão de 0,5 Hertz foram aplicados por sete minutos, para avaliar a resistência ao endurance. Parâmetros como produção máxima de força isométrica durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ), velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) e velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) foram avaliadas. Ao final do sétimo minuto, para avaliar a capacidade de produção de força após sete minutos de estímulo de endurance, a frequência de estímulo foi aumentada para 100 Hertz, onde foram registradas a força tetânica máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) e a resistência à fadiga, representada pelo tempo de redução de  $F_{\text{máx}}$  até 50%.

A área de secção transversa do diafragma ( $\text{cm}^2$ ) foi calculada pela fórmula: peso do músculo (g) / (comprimento do músculo (cm) x densidade do músculo ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )), assumindo a densidade de  $1,056 \text{ g}/\text{cm}^3$  (VRABAS *et al.*, 1999).  $T_{\text{máx}}$ ,  $+dF/dt$ ,  $-dF/dt$  e  $F_{\text{máx}}$  foram normalizados pela área de secção transversa dos músculos. Os resultados serão apresentados em  $\text{N}/\text{cm}^2$ . Os dados foram coletados através de um sistema de aquisição PowerLab 4/30, (AD Instrument) e em seguida analisados no software Lab Chart versão 7.3.7.

### 3.6 CONSUMO DE $\text{O}_2$ MITOCONDRIAL

O protocolo foi adaptado de Boushel *et al.*, 2007 e Pesta & Gnaiger, 2012. Após biópsia, os tecidos foram imediatamente colocados em placa de Petri pré-resfriada com solução de preservação de seguinte composição: MES- $\text{K}^+$  50mM, taurina 20mM, dithiothreitol 0.5mM,  $\text{MgCl}_2$  6.56mM, ATP 5.77mM, fosfocreatina 15mM, imidazol 20mM, tampão Ca-EGTA 10mM ( $\text{CaK}_2$  EGTA 2.77mM +  $\text{K}_2$  EGTA 7.23 mM), pH 7.1 ajustado com KOH a  $0^\circ\text{C}$ .

Os tecidos conectivos foram removidos e as fibras musculares separadas mecanicamente em miofibrilas. Na sequência as miofibrilas foram secas gentilmente com papel filtro, pesadas e separadas em sets de 2mg. Para permeabilização química, as miofibrilas foram transferidas para poços de 2ml contendo solução de saponina na solução de preservação (50 µg/mL), em banho de gelo por 30 minutos. A respiração foi mensurada por um oxígrafo de alta resolução (Orosboros Instruments, Insbruck, Áustria) utilizando duas câmaras à 37°C sob leve agitação. O meio de reação do oxígrafo era composto de: EGTA 0,5mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, lactobionato de potássio 60mM, taurina 20mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, HEPES 20mM, pH 7.1, sacarose 110mM, BSA livre de ácidos graxos 1g/L.

A respiração mitocondrial foi avaliada pelo fluxo de O<sub>2</sub> após a adição sequencial de: Malato 1.5mM, Glutamato 19mM como substratos do complexo I; ADP 4,8mM como substrato do complexo III e Rotenona 0,1µM como inibidor do complexo III. Os resultados serão apresentados em picomol por segundo por miligrama de tecido (pmol seg<sup>-1</sup> mg de tecido<sup>-1</sup>).

### 3.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os músculos foram homogenizados em tampão potássio fosfato (0.1M, pH 6.5) e centrifugados a 9000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi diluído em 1:10 e utilizado para mensurar os níveis totais de espécies reativas de oxigênio (ROS), atividade de superóxido dismutase (SOD) e atividade de catalase (CAT). Os resultados serão apresentados de acordo com a quantidade total de proteína nas amostras (BRADFORD, 1976).

#### 3.7.1 Mensuração de ROS total

Para determinar ROS total nos músculos, amostras foram incubadas em diacetato 2'7' dichlorofluoresceína (DCFH) e diluídas em 10 µmol de dimetilsulfóxido por 40 minutos no escuro. Em seguida colocadas em placa escura de 96 poços. A fluorescência foi mensurada em um espectrofotômetro fluorimétrico a 485/20, 528/20 (KESTON; BRANDT, 1965; LEBEL et al., 1990). Os resultados serão apresentados em intensidade de fluorescência.

### 3.7.2 Atividade da SOD

A atividade da SOD é quantificada através da habilidade da SOD tecidual inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol. Para isto, amostras foram adicionadas em solução tampão contendo Tris HCl 200mM e EDTA 2mM. Na sequência incubadas em solução de pirogalol 15mM por 20 minutos à 25°C. A reação foi interrompida com solução de HCl 1M e a absorbância foi lida a 440nm em espectrofotômetro. O volume de enzima que inibiu a reação em 50% (IC50) é definida como unidade de SOD. Os resultados serão apresentados em unidades de SOD por miligrama de proteína total (USOD mg de proteína<sup>-1</sup>) (GAO et al., 1998).

### 3.7.3 Atividade da CAT

A reação foi realizada utilizando 5mM de peróxido de hidrogênio em 50mM de tampão potássio fosfato, pH 7.0, na presença da proteína citosólica. A atividade da CAT foi monitorada por 60 segundos a 240nm em espectrofotômetro, utilizando o coeficiente de extinção de 41mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Os resultados serão apresentados como atividade da CAT por miligrama de proteína (AEBI, 1984).

### 3.7.4 Peroxidação lipídica tecidual (LPO)

A mensuração de LPO nas amostras dos músculos foi realizada através do método xilenol laranja, como descrito por Jiang, Woollard & Wolff, 1991. Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. É baseado no princípio de que as hidroperóxidas oxidam ferro em íon ferroso e este íon se liga ao corante xilenol laranja. Para isso o homogenato foi resuspenso com MeOH na proporção 1:1 e centrifugado a 8000g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado à solução de trabalho de seguinte composição: MeOH 90%, xilenol laranja 100µM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25mM, BHT 4mM e Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250µM. As amostras foram então incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro a 560nm. Para determinar a quantidade de peroxidação lipídica nas amostras foi utilizado o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 4.3 \times 10^4 M^{-1}$ ). Os resultados serão apresentados como hidroperóxidas (nmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparação de uma única condição experimental entre DM e controle, foi utilizado o teste t-Student. Para comparação de uma única condição experimental entre múltiplos grupos, foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. Para múltiplas comparações foi utilizado ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. Para a análise estatística e plotagem dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 System (San Diego, CA, USA). Foi aceito diferença estatisticamente significativa entre grupos quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula for inferior a 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESO DOS ANIMAIS

Após seis semanas do diagnóstico de DM e trinta sessões de treinamento, todos os animais foram pesados. Reduções significativas médias de 26% no peso corporal foram observadas nos grupos DM comparados aos grupos controle. Os valores médios da massa corpórea dos animais em gramas (g) do CS (n = 10) e do DS (n = 8) foram:  $395,85 \pm 8,39$  vs  $304,16 \pm 7,08$  ( $p < 0,001$ ). Os valores do CE (n = 9) e do DE (n = 10) foram:  $376,14 \pm 9,44$  vs  $271,00 \pm 9,35$  ( $p < 0,001$ ). Os valores do CI (n = 10) e do DI (n = 10) foram:  $381,33 \pm 8,04$  vs  $277,12 \pm 6,37$  ( $p < 0,001$ ).

### 4.2 GLICEMIA SANGUÍNEA

A concentração de glicose sanguínea de todos os animais foi checada antes da anestesia anterior à eutanásia. Aumentos significativos médios de 358% na glicemia foram observados nos grupos DM comparados aos grupos controle. Os valores médios em miligramas por decilitro de sangue (mg/dL) do CS e do DS foram:  $116,71 \pm 4,88$  vs  $479,66 \pm 29,48$  ( $p < 0,001$ ). Os valores do CE e do DE foram:  $107,42 \pm 3,12$  vs  $522,12 \pm 22,01$  ( $p < 0,001$ ). Os valores do CI e do DI foram:  $104,42 \pm 3,45$  vs  $500,50 \pm 24,93$  ( $p < 0,001$ ).

### 4.3 PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE COM MÚSCULO DIAFRAGMA

A Figura 1 representa o registro típico dos experimentos com músculo diafragma, isolados e estimulados eletricamente de forma direta. Do primeiro ao sétimo minutos do experimento os músculos foram estimulados eletricamente com 24 Volts à frequência de 0,5 Hertz, onde foram registrados a força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ), a velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) e a velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ). Ao final do sétimo minuto, a frequência de estímulo foi aumentada para 100 Hertz, onde foram registradas a força tetânica máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) e a resistência à fadiga, representado pelo tempo de redução de  $F_{\text{máx}}$  até 50%. Na Figura 1, A é o registro da  $T_{\text{máx}}$ , B é o registro da



+dF/dt, C é o registro da -dF/dt, D é o registro da F<sub>máx</sub> e E o registro da resistência à fadiga (tempo de redução de F<sub>máx</sub> até 50%).

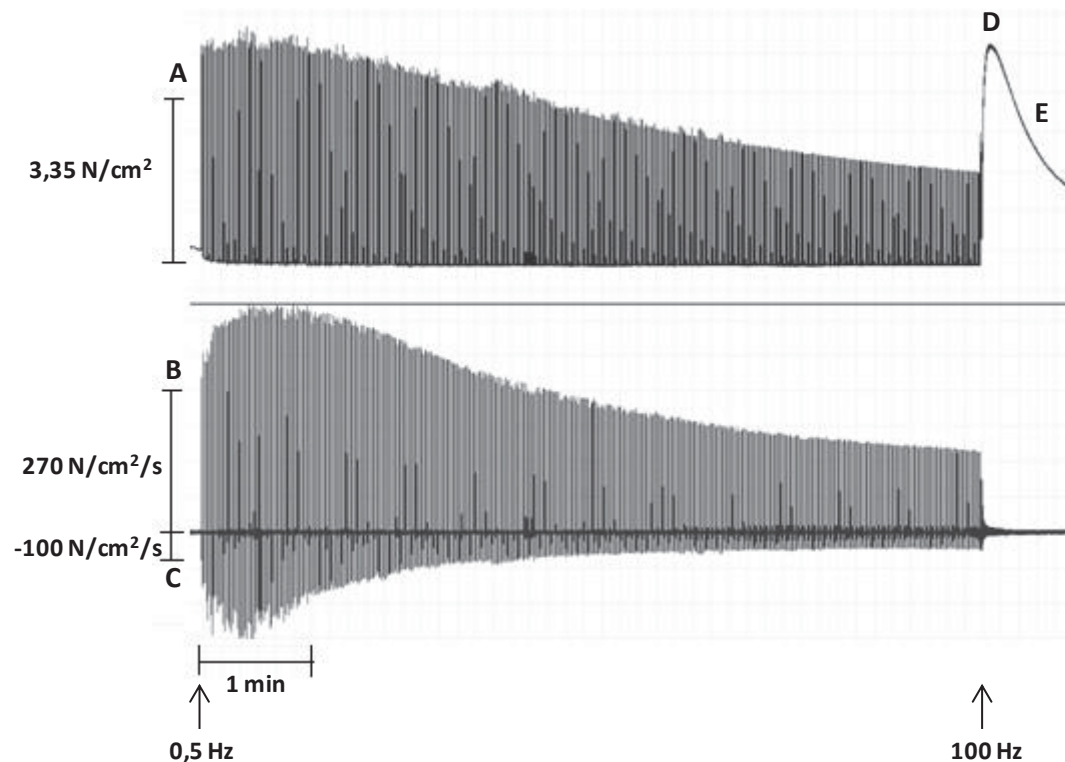


Figura 1: Registro da produção de força isométrica de diafragma de rato, isolado estimulado eletricamente de forma direta. A: força isométrica máxima durante contrações repetidas (T<sub>máx</sub>); b: velocidade máxima de contração (+dF/dt); c: velocidade máxima de relaxamento (-dF/dt); d: força tetânica máxima (F<sub>máx</sub>); e: resistência à fadiga (tempo de redução de F<sub>máx</sub> até 50%).

#### 4.3.1 Força isométrica máxima durante contrações repetidas (T<sub>máx</sub>)

Os dados de T<sub>máx</sub> estão apresentados nas figuras 2A-E. Na figura 2A, a comparação intragrupo revelou nos grupos controle redução significativa na produção de força no grupo intervalado. Comparado ao CS, observou-se no CI redução significativa de 19,9% no primeiro ( $p < 0,001$ ), 21,3% no segundo ( $p < 0,001$ ), 21,3% no terceiro ( $p < 0,001$ ), 19,3% no quarto ( $p < 0,01$ ) e 20,3% no quinto minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). Comparado ao CE, observou-se no CI redução significativa de 18,5% no primeiro ( $p < 0,001$ ), 18,4% no segundo ( $p < 0,001$ ) e 14,7% no terceiro minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). Na figura 2B, a comparação intragrupo revelou nos grupos DM redução significativa de 15,6% no DE comparado ao DS, apenas no primeiro minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). A comparação entre

grupos revelou apenas nos grupos endurance redução significativa na produção de força do grupo DM (figura 1D). Comparado ao CE, DE reduziu 21,7% no primeiro ( $p < 0,001$ ), 21,5% no segundo ( $p < 0,01$ ) e 20,4% no terceiro minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). Os valores completos estão na tabela I em apêndices.

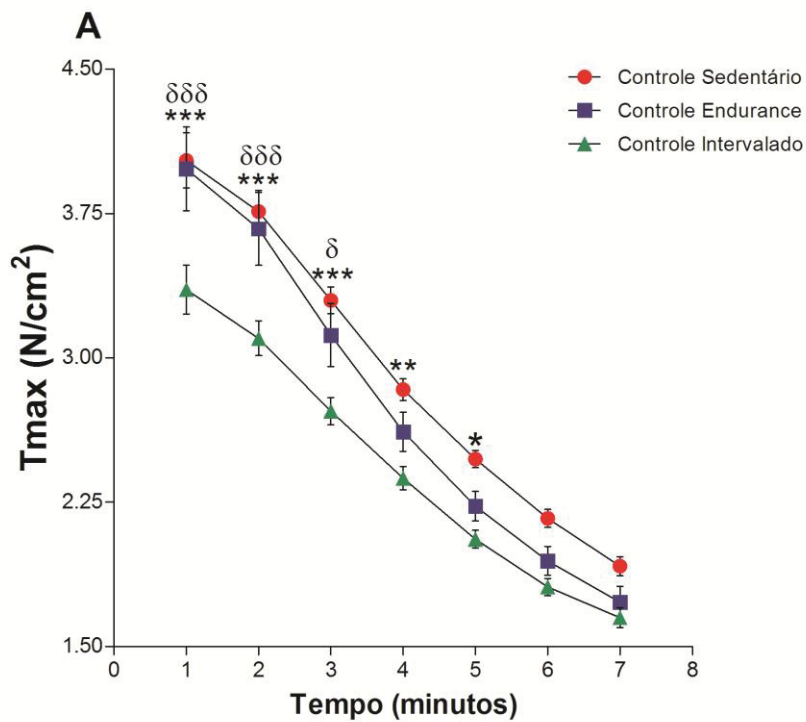


Figura 2A: Força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ) dos grupos controle. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado ( $\text{N}/\text{cm}^2$ )  $\pm$  epm. \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  entre CS e CI.  $\delta$  representa  $p < 0,05$ ,  $\delta\delta$  representa  $p < 0,01$  e  $\delta\delta\delta$  representa  $p < 0,001$  entre CE e CI. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , CE,  $n = 9$ , CI,  $n = 10$ .

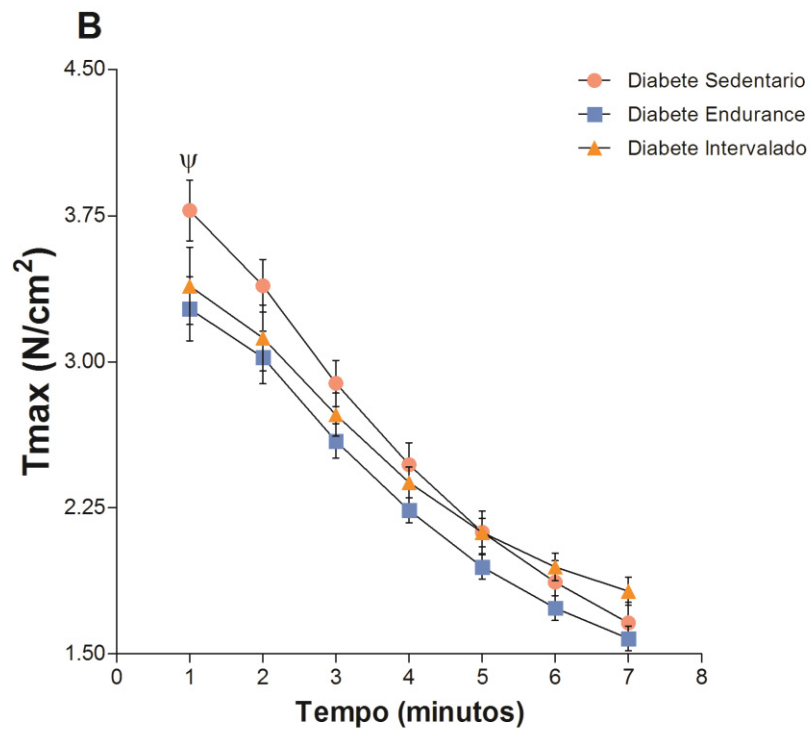


Figura 2B: Força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{máx}$ ) dos grupos DM. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado (N/cm<sup>2</sup>)  $\pm$  epm.  $\psi$  representa  $p < 0,05$  entre DS e DE. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. DS,  $n = 8$ , DE,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

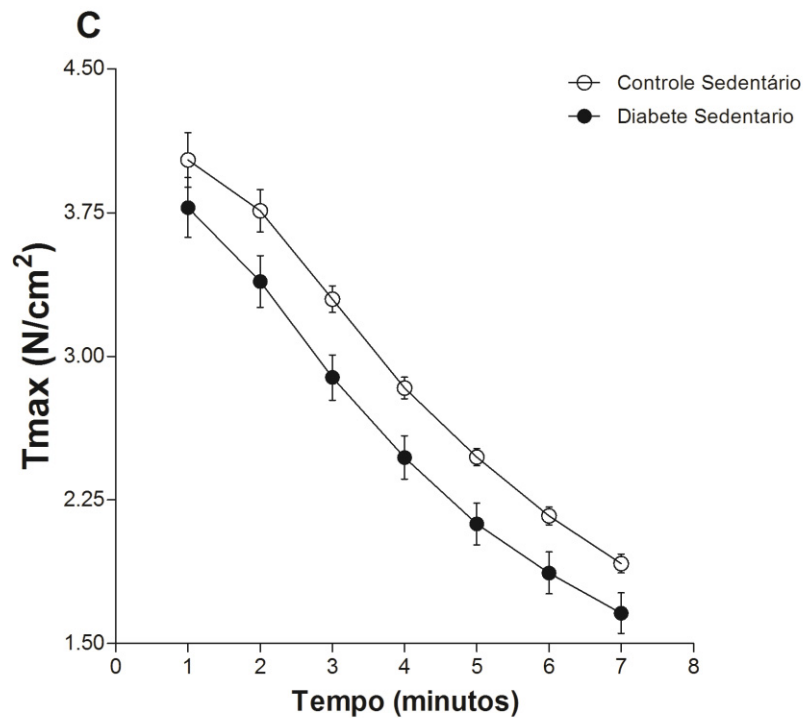


Figura 2C: Força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{máx}$ ) dos grupos sedentários. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado (N/cm<sup>2</sup>)  $\pm$  epm. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , DS,  $n = 8$ .

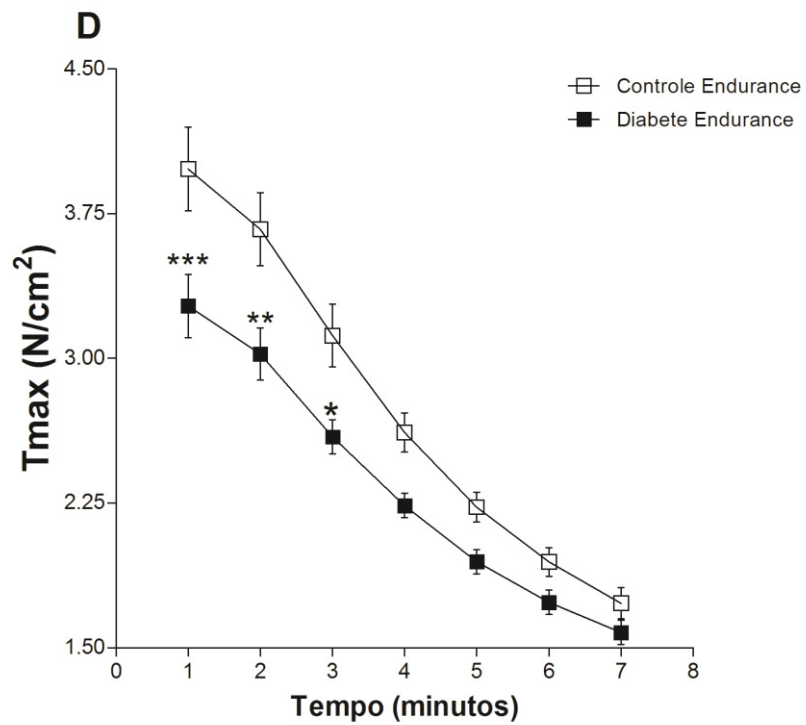


Figura 2D: Força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{máx}$ ) dos grupos endurance. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado (N/cm<sup>2</sup>)  $\pm$  epm. \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$ , \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CE,  $n = 9$ , DE,  $n = 10$ .

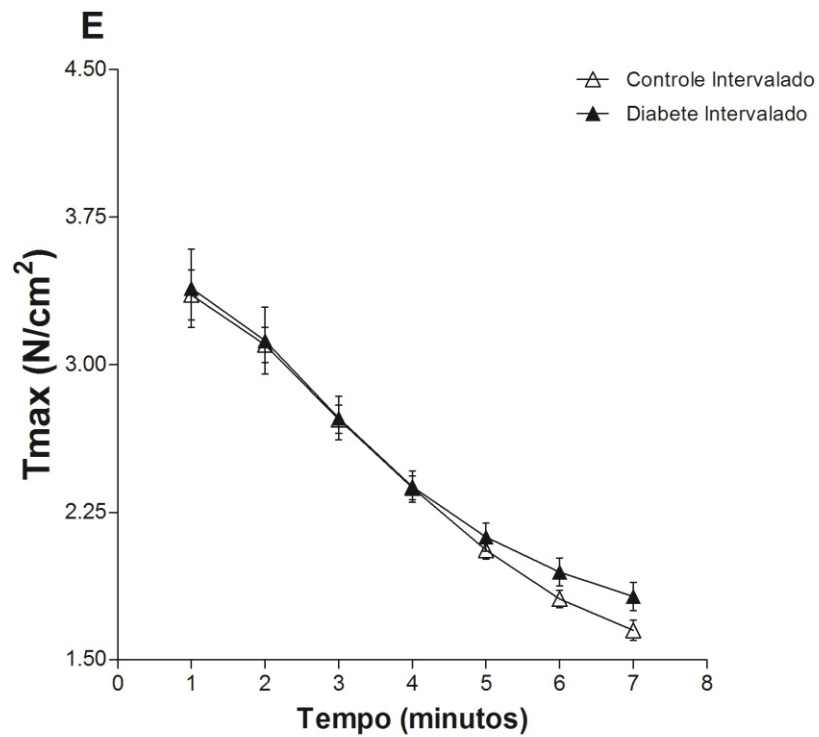


Figura 2E: Força isométrica máxima durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ) dos grupos intervalado. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado ( $\text{N}/\text{cm}^2$ )  $\pm$  epm. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CI,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

#### 4.3.2 Velocidade máxima de contração (+dF/dt)

Os dados de +dF/dt estão apresentados nas figuras 3A-E. Na figura 3A, a comparação intragrupo revelou nos grupos controle redução significativa de 12,2% no CI comparado ao CS, apenas no primeiro minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). Na figura 3B, a comparação intragrupo revelou nos grupos DM aumento significativo de 30,2% no DI comparado ao DS, apenas no sétimo minuto de experimento ( $p < 0,05$ ). A comparação entre grupos revelou redução significativa na +dF/dt em todos os grupos DM (figuras 3C, 3D e 3E). Comparado ao CS, observou-se no DS redução significativa de 23,7% no primeiro ( $p < 0,001$ ), 26,2% no segundo ( $p < 0,001$ ), 28% no terceiro ( $p < 0,001$ ), 29,3% no quarto ( $p < 0,001$ ), 30,7% no quinto ( $p < 0,001$ ), 30,3% no sexto ( $p < 0,01$ ) e 33,9% no sétimo minuto de experimento ( $p < 0,01$ ). Comparado ao CE, observou-se no DE redução significativa de 27,8% no primeiro ( $p < 0,001$ ), 22% no segundo ( $p < 0,001$ ), 22,6% no terceiro ( $p < 0,01$ ) e 20,9% no quarto minuto de experimento ( $p < 0,01$ ). Comparado ao CI, observou-se no DI redução significativa de 19,9% no primeiro ( $p < 0,001$ ) e 17,1% no segundo minuto de experimento ( $p < 0,01$ ). Os valores completos estão na tabela II em apêndices.

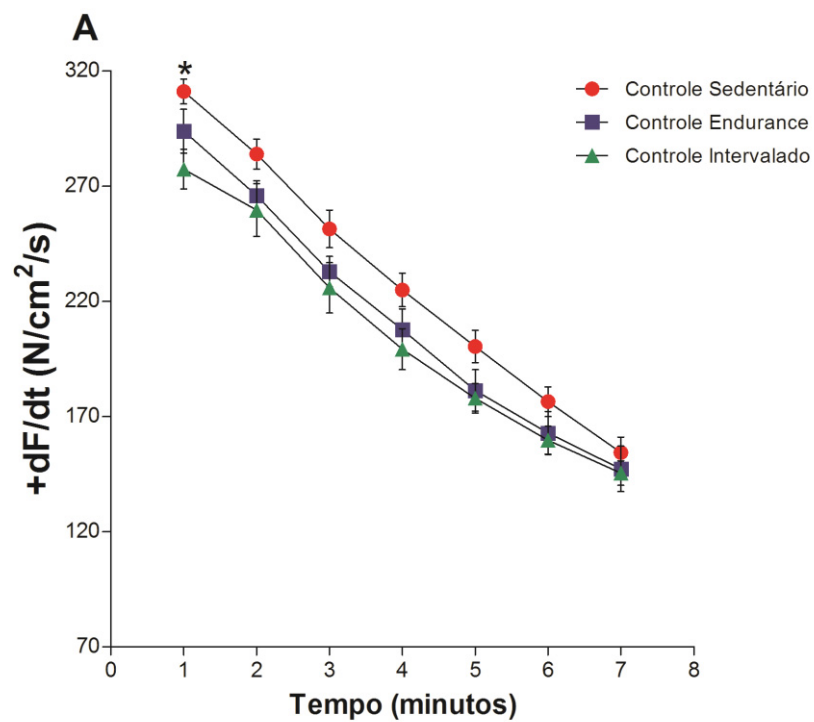


Figura 3A: Velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) dos grupos controle. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. \* representa  $p < 0,05$  entre CS e CI. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , CE,  $n = 9$ , CI,  $n = 10$ .

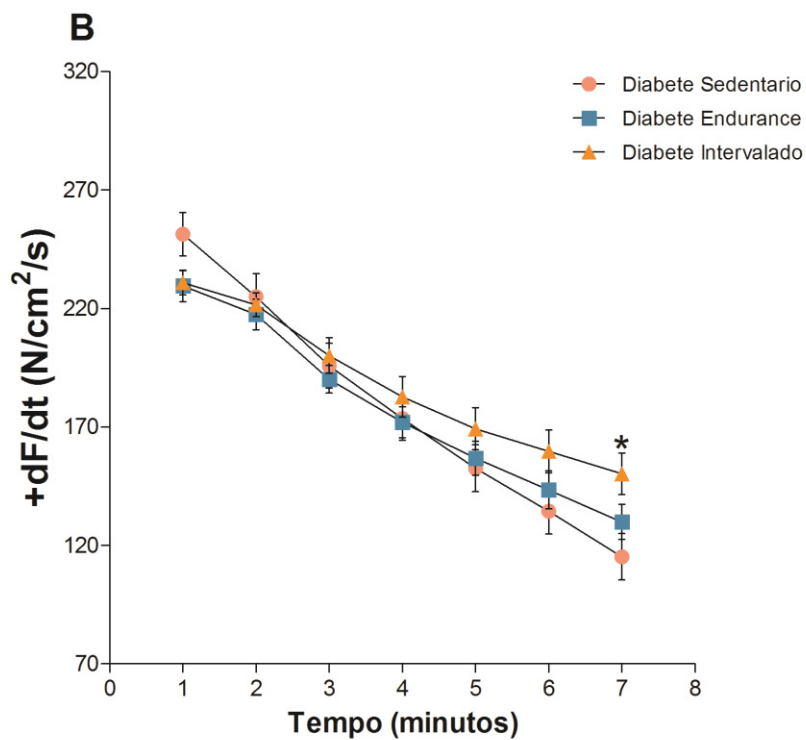


Figura 3B: Velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) dos grupos DM. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. \* representa  $p < 0,05$  entre DI e DS. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. DS,  $n = 8$ , DE,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

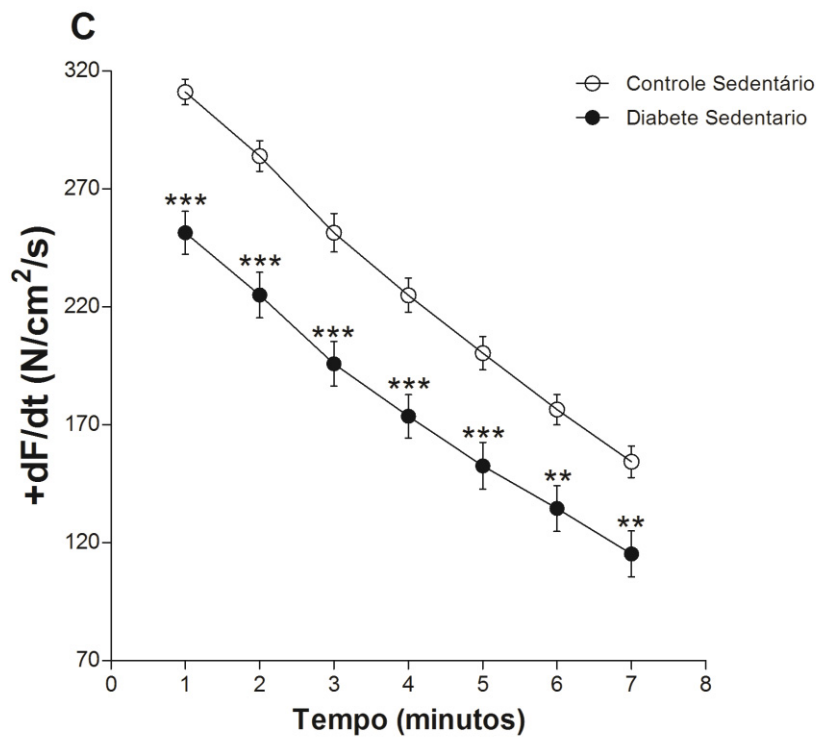


Figura 3C: Velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) dos grupos sedentários. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. \*\* representa  $p < 0,01$ , \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , DS,  $n = 8$ .

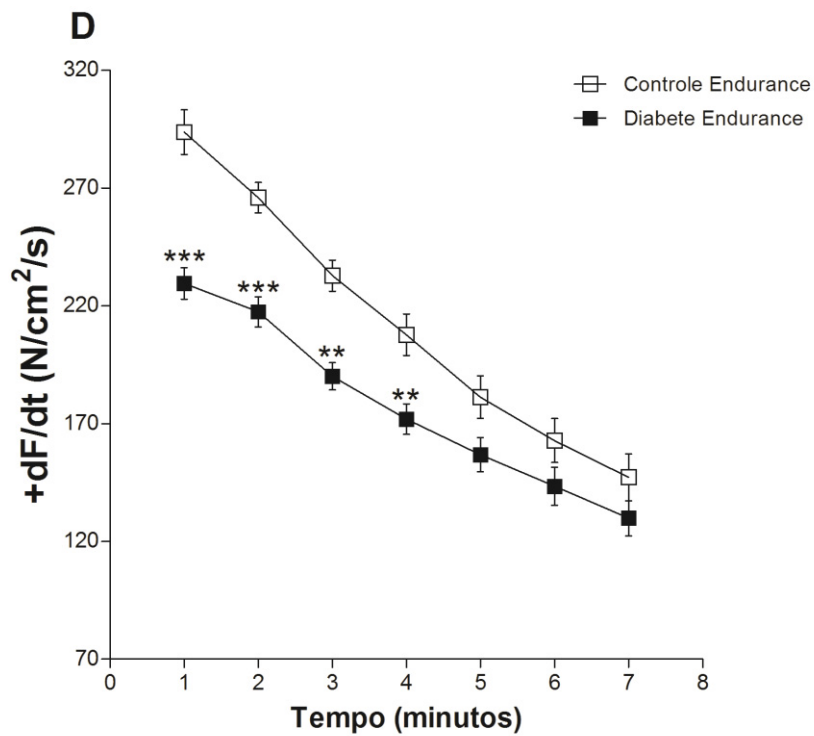


Figura 3D: Velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) dos grupos endurance. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. \*\* representa  $p < 0,01$ , \*\*\*

representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CE,  $n = 9$ , DE,  $n = 10$ .

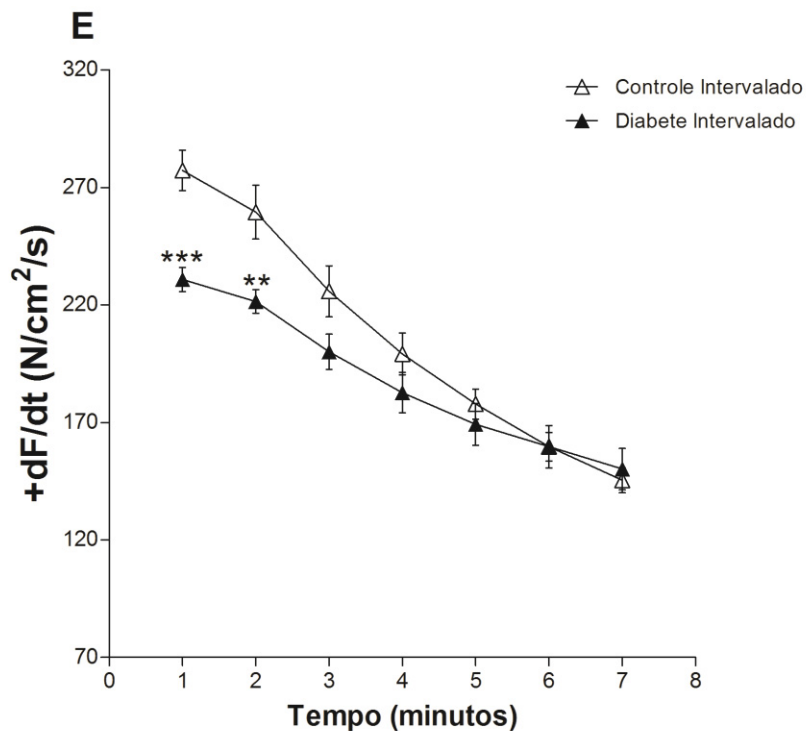


Figura 3E: Velocidade máxima de contração (+dF/dt) dos grupos intervalado. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo ( $\text{N/cm}^2/\text{s}$ )  $\pm$  epm. \*\* representa  $p < 0,01$ , \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CI,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

#### 4.3.3 Velocidade máxima de relaxamento (-dF/dt)

Os dados de -dF/dt estão apresentados nas figuras 4A-E. Nas figuras 4A e 4B, as comparações intragrupo não revelaram quaisquer diferenças entre grupos controle ou entre grupos DM. A comparação entre grupos revelou redução significativa na -dF/dt em todos os grupos DM (figuras 4C, 4D e 4E). Comparado ao CS, observou-se no DS redução significativa de 41,7% no primeiro minuto de experimento ( $p < 0,001$ ). Comparado ao CE, observou-se no DE redução significativa de 79,3% no primeiro ( $p < 0,001$ ) e 50,5% no segundo minuto de experimento ( $p < 0,001$ ). Comparado ao CI, observou-se no DI redução significativa de 63% no primeiro ( $p < 0,001$ ) e 40% no segundo minuto de experimento ( $p < 0,001$ ). Os valores completos estão na tabela III em apêndices.



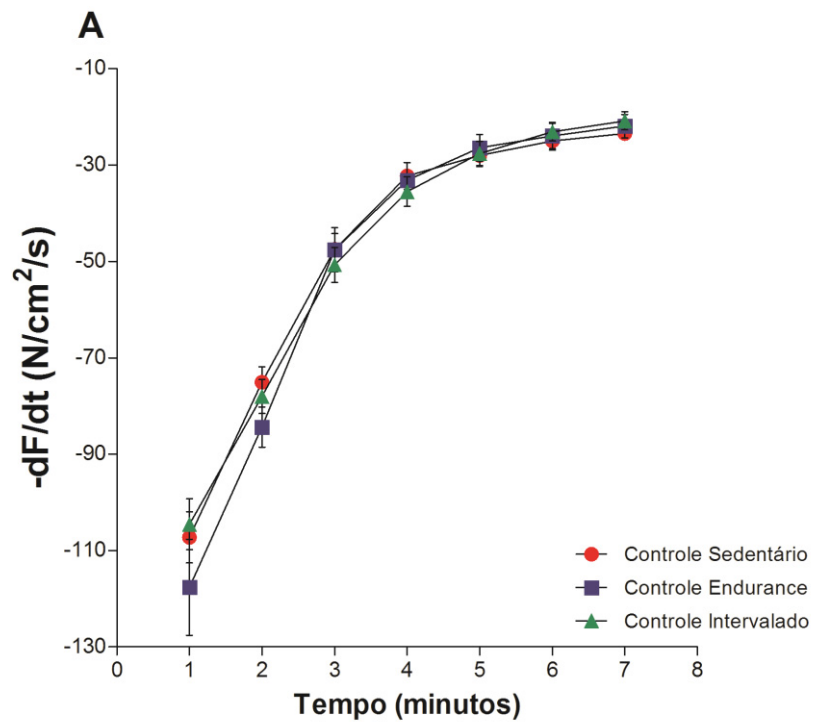


Figura 4A: Velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) dos grupos controle. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS, n = 10, CE, n = 9, CI, n = 10.

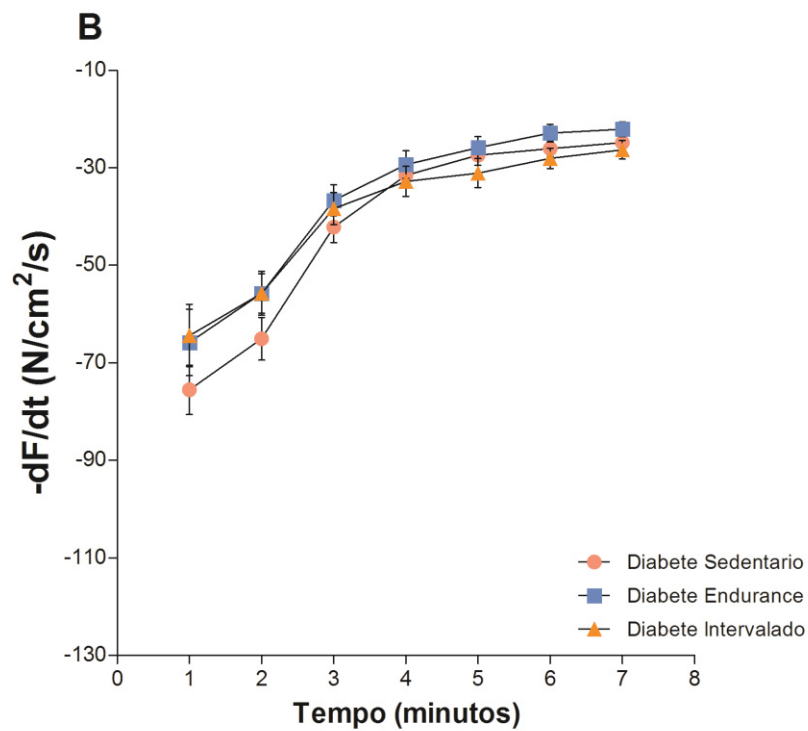


Figura 4B: Velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) dos grupos DM. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo (N/cm<sup>2</sup>/s)  $\pm$  epm. Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. DS, n = 8, DE, n = 10, DI, n = 10.

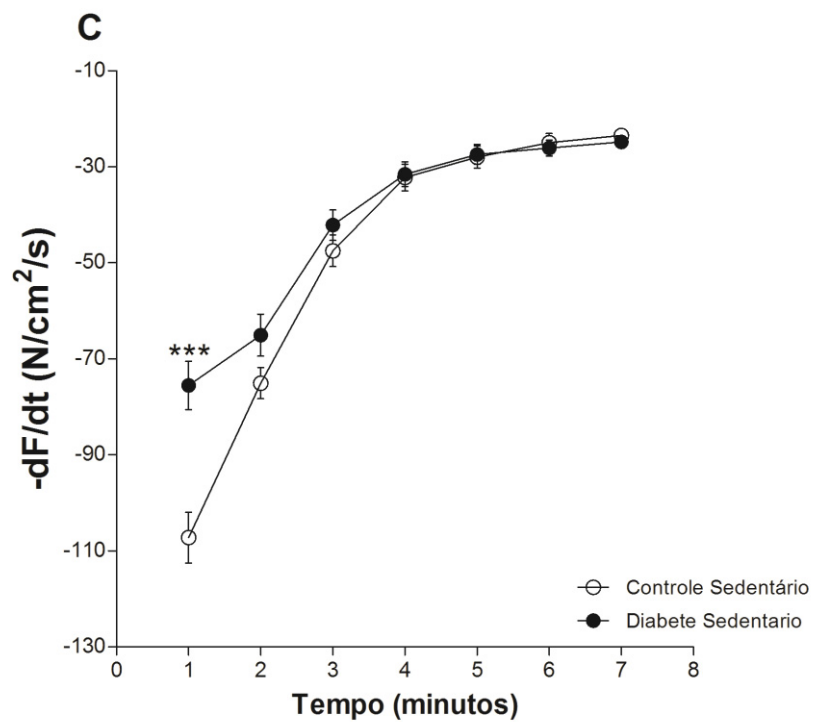


Figura 4C: Velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) dos grupos sedentários. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo ( $N/cm^2/s$ )  $\pm$  epm. \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , DS,  $n = 8$ .

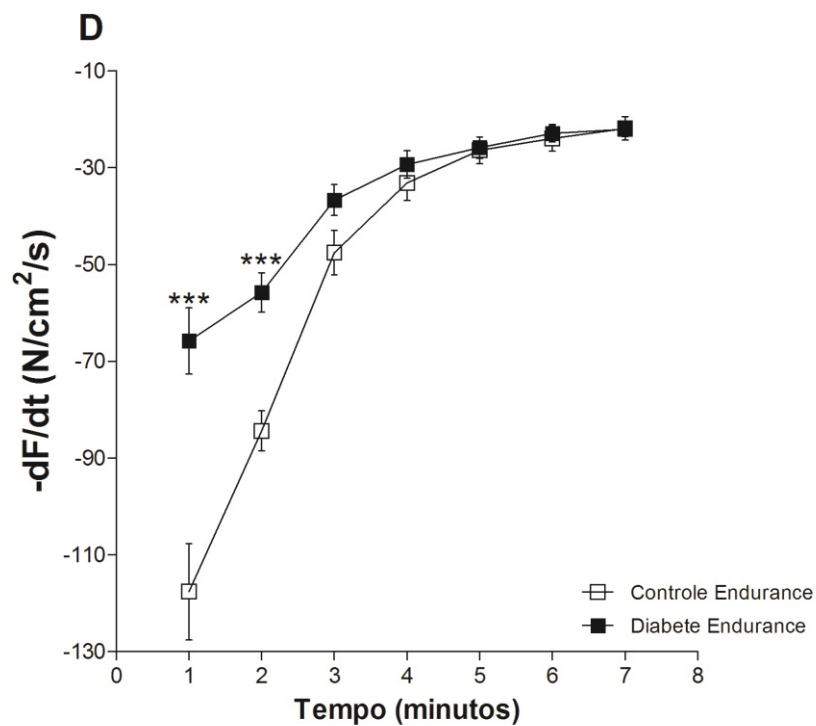


Figura 4D: Velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) dos grupos endurance. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo ( $N/cm^2/s$ )  $\pm$  epm. \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CE,  $n = 9$ , DE,  $n = 10$ .

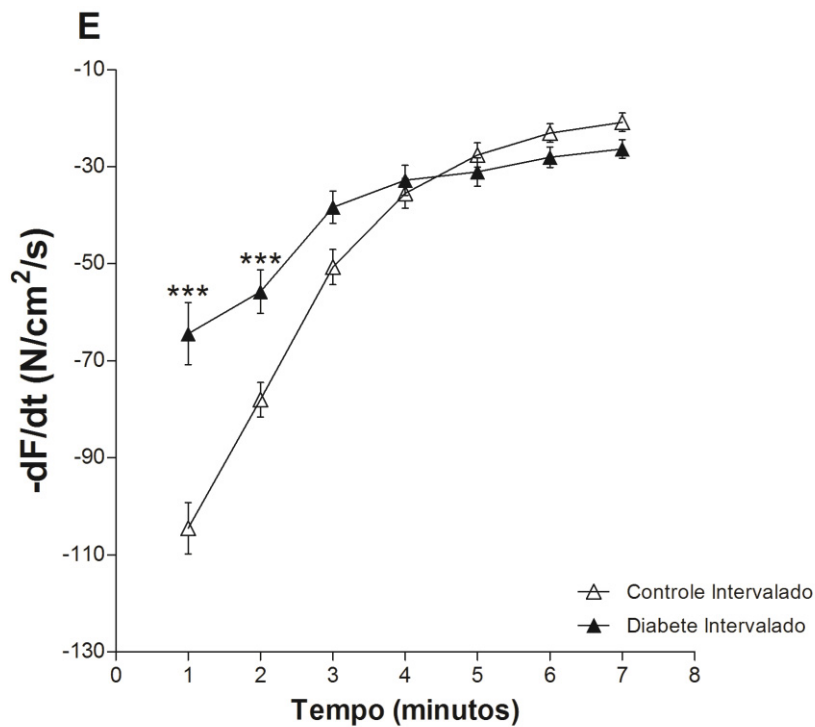


Figura 4E: Velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) dos grupos intervalado. Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado por segundo ( $N/cm^2/s$ )  $\pm$  epm. \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. CI,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

#### 4.3.4 Força tetânica máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ )

Para avaliar a capacidade máxima de produção de força após sete minutos de estímulo de endurance, a frequência de estímulo foi aumentada de 0,5 para 100Hertz, quando foi registrada a força tetânica máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ ), representado na figura 5. Na comparação entre grupos, foi observada redução significativa de 16% no DS ( $p = 0,023$ ) e aumento significativo de 20% no DI ( $p < 0,001$ ). Na comparação intragrupos, observou-se no CI redução significava de 22,5% comparado a CS ( $p = 0,008$ ) e no DI aumento significativo de 18,9% comparado a DS ( $p = 0,012$ ).

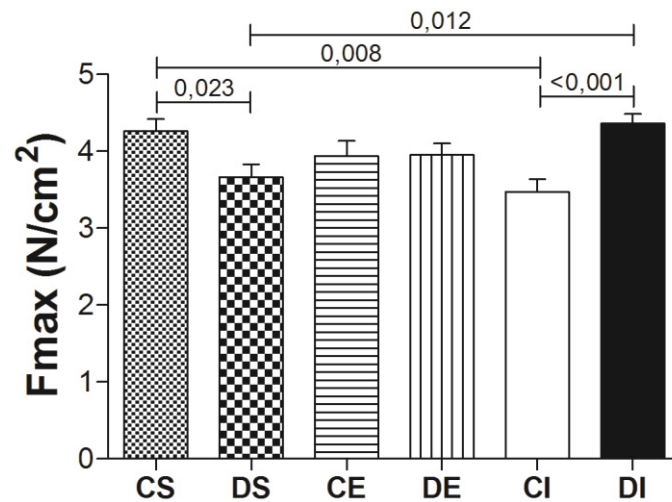


Figura 5: Força tetânica máxima (F<sub>máx</sub>). Valores expressos em Newtons por centímetro quadrado (N/cm<sup>2</sup>) ± epm. Os valores dos grupos CS e DS foram: 4,25 ± 0,16 vs. 3,66 ± 0,17 ( $p = 0,023$ ), CE e DE foram: 3,93 ± 0,19 vs. 3,95 ± 0,15 ( $p = 0,962$ ), CI e DI foram: 3,47 ± 0,16 vs. 4,35 ± 0,12 ( $p < 0,001$ ). CS vs. CI ( $p = 0,008$ ); DS vs. DI ( $p = 0,012$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. CS,  $n = 10$ , CE,  $n = 9$ , CI,  $n = 10$ , DS,  $n = 8$ , DE,  $n = 10$ , DI,  $n = 10$ .

#### 4.3.5 Resistência à fadiga

A resistência à fadiga foi analisada pelo tempo de redução da F<sub>máx</sub> até 50%. Os dados estão apresentados na figura 6. Na comparação entre grupos, foram observados aumentos significativos em todos os grupos DM. DS aumentou 28% ( $p = 0,017$ ), DE aumentou 64% ( $p < 0,001$ ) e DI aumentou 73,3% ( $p < 0,001$ ). Na comparação intragrupos, observou-se que DI aumentou 37,2% comparado a DS ( $p = 0,011$ ).

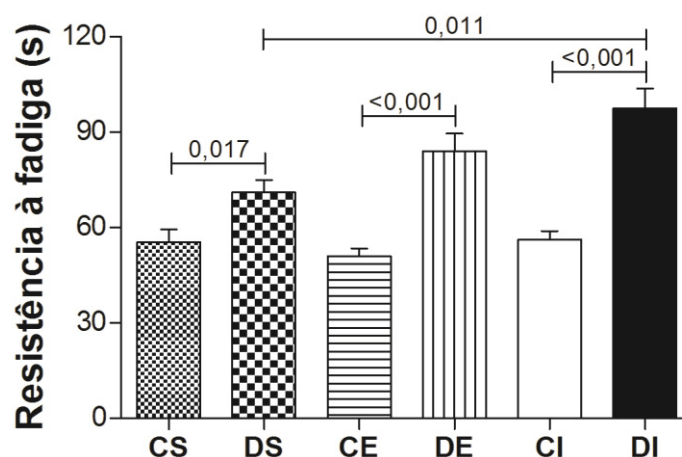


Figura 6: Resistência à fadiga. Valores expressos em segundos (s). Os valores dos grupos CS e DS foram:  $55,44 \pm 4,02$  vs.  $71,00 \pm 3,90$  ( $p = 0,017$ ), CE e DE foram:  $51,00 \pm 2,44$  vs.  $84,00 \pm 5,53$  ( $p < 0,001$ ), CI e DI foram:  $56,22 \pm 2,73$  vs.  $97,44 \pm 6,29$  ( $p < 0,001$ ). DS vs. DI ( $p = 0,011$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. CS, n = 10, CE, n = 9, CI, n = 10, DS, n = 8, DE, n = 10, DI, n = 10.

#### 4.4 CONSUMO DE O<sub>2</sub> MITOCONDRIAL

O consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial dos músculos diafragma está apresentado na figura 7. Na comparação entre grupos, não foram observadas diferenças significativas. Na comparação intragrupos, observou-se que CE reduziu 34,6% comparado a CS ( $p = 0,044$ ) e 40,4% comparado a CI ( $p = 0,024$ ).

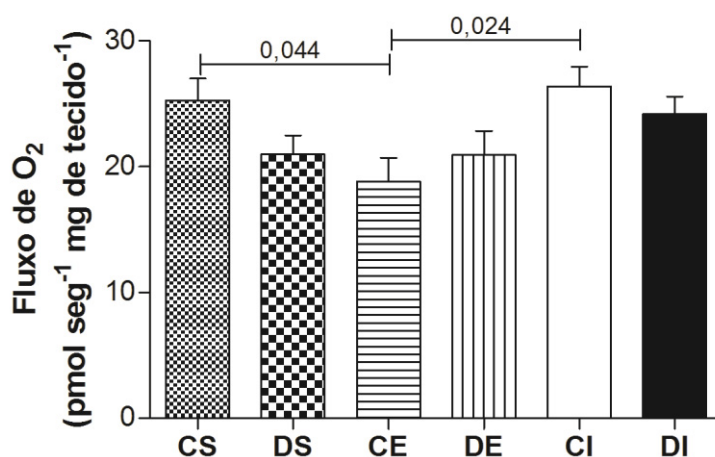


Figura 7: Consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial. Valores expressos em picomol por segundo por miligrama de tecido (pmol seg<sup>-1</sup> mg de tecido<sup>-1</sup>) ± epm. Os valores dos grupos CS e DS foram:  $25,26 \pm 1,73$  vs.  $20,99 \pm 1,49$  ( $p = 0,081$ ), CE e DE foram:  $18,83 \pm 1,87$  vs.  $20,93 \pm 1,89$  ( $p = 0,445$ ), CI e DI foram:  $26,37 \pm 1,59$  vs.  $24,21 \pm 1,37$  ( $p = 0,324$ ). CE vs. CS ( $p = 0,044$ ); CE vs. CI ( $p = 0,024$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. Em todos os grupos n = 9 de 3 músculos cada.

#### 4.5 PARÂMETROS OXIDATIVOS

##### 4.5.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) tecidual total

Os valores obtidos a partir da quantificação de ROS tecidual total estão apresentados na figura 8. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos ou intragrupos.

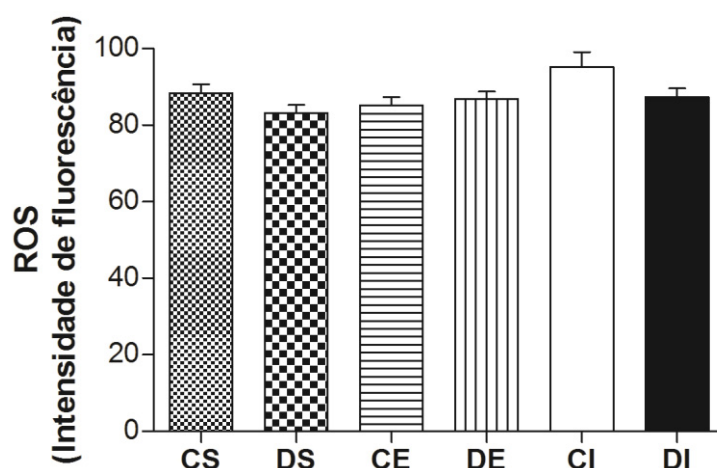


Figura 8: Espécies reativas de oxigênio (ROS) tecidual total. Valores expressos em intensidade de fluorescência  $\pm$  epm. Os valores dos grupos CS e DS foram:  $88,25 \pm 2,43$  vs.  $83,17 \pm 2,17$  ( $p = 0,195$ ), CE e DE foram:  $85,13 \pm 2,25$  vs.  $86,75 \pm 2,05$  ( $p = 0,612$ ), CI e DI foram:  $95,30 \pm 3,84$  vs.  $87,40 \pm 2,23$  ( $p = 0,113$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via. CS,  $n = 4$ , DS,  $n = 4$ , CE,  $n = 4$ , DE,  $n = 4$ , CI,  $n = 5$ , DI,  $n = 5$ .

#### 4.5.2 Peroxidação lipídica tecidual (LPO)

Os dados da quantificação da LPO tecidual está apresentada na figura 9. Na comparação entre grupos, foi observada redução de 47,5% no CE ( $p = 0,007$ ). Na comparação intragrupos, observou-se redução de 60,6% no CE quando comparado a CS ( $p = 0,005$ ).

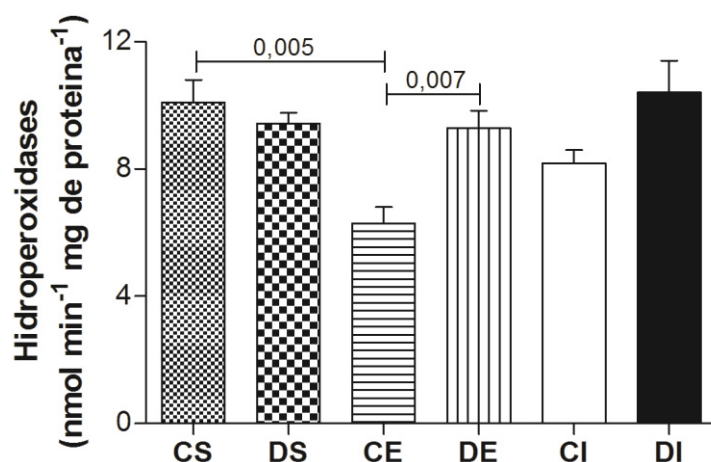


Figura 9: Peroxidação lipídica tecidual (LPO). Valores expressos em hidroperoxidases (nmol min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>)  $\pm$  epm. Os valores dos grupos CS e DS foram:  $10,10 \pm 0,70$  vs.  $9,43 \pm 0,32$  ( $p = 0,484$ ), CE e DE foram:  $6,29 \pm 0,51$  vs.  $9,28 \pm 0,55$  ( $p = 0,007$ ), CI e DI foram:  $8,18 \pm 0,40$  vs.  $10,40 \pm 1,00$  ( $p = 0,075$ ). CS vs. CE ( $p = 0,005$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado.

Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. CS, n = 4, DS, n = 4, CE, n = 4, DE, n = 4, CI, n = 5, DI, n = 5.

#### 4.5.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD) tecidual

Os dados da quantificação da atividade da SOD tecidual estão apresentados na figura 10. Na comparação entre grupos, foi observado aumento de 120,8% no DE ( $p = 0,011$ ) e 50,2% no DI ( $p = 0,003$ ). Na comparação intragrupos, observou-se aumento de 85% no DE quando comparado ao DS ( $p = 0,024$ ) e 87,9% quando comparado ao DI ( $p = 0,010$ ).

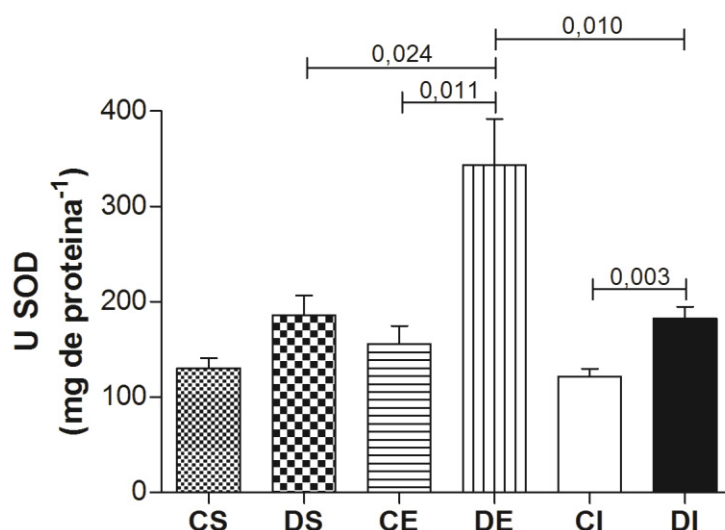


Figura 10: Atividade da superóxido dismutase (SOD) tecidual. Valores expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína  $\pm$  epm. Os valores dos grupos CS e DS foram:  $130,48 \pm 10,57$  vs.  $185,76 \pm 21,15$  ( $p = 0,051$ ), CE e DE foram:  $155,61 \pm 19,28$  vs.  $343,66 \pm 48,09$  ( $p = 0,011$ ), CI e DI foram:  $121,70 \pm 8,23$  vs.  $182,85 \pm 12,08$  ( $p = 0,003$ ). DE vs. DS ( $p = 0,024$ ); DE vs. DI ( $p = 0,010$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. CS, n = 4, DS, n = 4, CE, n = 4, DE, n = 4, CI, n = 5, DI, n = 5.

#### 4.5.4 Atividade da catalase (CAT) tecidual

Os dados da quantificação da atividade da CAT tecidual estão apresentados na figura 11. Na comparação entre grupos, foi observado aumento significativo em todos os grupos DM. DS aumentou 105% ( $p = 0,003$ ), DE aumentou 797,1% ( $p < 0,001$ ) e DI aumentou 63,2% ( $p = 0,003$ ). Na comparação intragrupos, observou-se

redução de 337,3% no CE quando comparado ao CS ( $p = 0,002$ ) e 420,5% quando comparado ao CI ( $p < 0,001$ ).

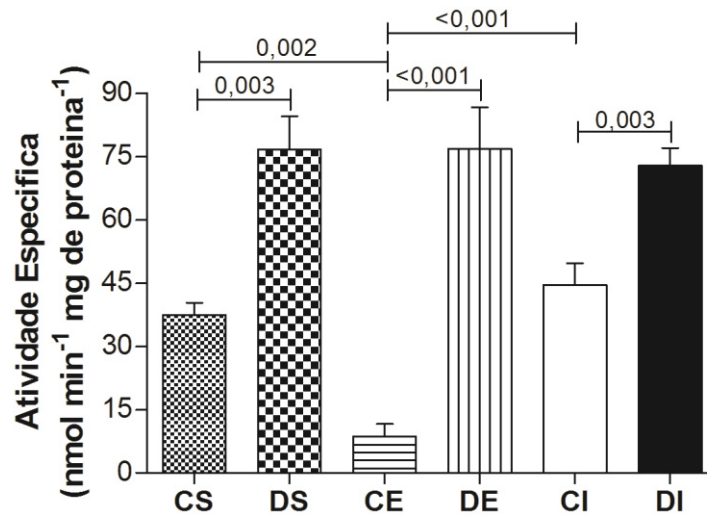


Figura 11: Atividade da catalase (CAT) tecidual. Valores expressos em nanomol por miligrama de proteína  $\pm$  epm. Os valores dos grupos CS e DS foram:  $37.43 \pm 2.89$  vs.  $76.72 \pm 7.78$  ( $p = 0.003$ ), CE e DE foram:  $8.559 \pm 3.00$  vs.  $76.85 \pm 9.81$  ( $p < 0.001$ ), CI e DI foram:  $44.56 \pm 5.14$  vs.  $72.80 \pm 4.16$  ( $p = 0.003$ ). CE vs. CI ( $p < 0,001$ ); CE vs. CS ( $p = 0,002$ ). Teste estatístico entre grupos: Teste t de Student não pareado. Teste estatístico intragrupos: ANOVA de uma via e pós-teste de Bonfferoni. CS,  $n = 4$ , DS,  $n = 4$ , CE,  $n = 4$ , DE,  $n = 4$ , CI,  $n = 5$ , DI,  $n = 5$ .



## 5 DISCUSSÃO

O DM com baixo controle glicêmico, bem como a realização regular de exercícios físicos, são estímulos que promovem adaptações fisiológicas e bioquímicas nos músculos, incluindo o diafragma, tanto para a manutenção da homeostase, quanto para atender ao aumento da demanda metabólica.

No DM, devido à redução ou incapacidade de captação de glicose pelos tecidos, ocorre aumento na oxidação de ácidos graxos e consequente aumento na formação de ROS e de corpos cetônicos (ANDERSON, 2015; YAN et al., 2011). Os corpos cetônicos reduzem o pH sanguíneo, o que leva a aumento na ventilação alveolar, aumentando a excreta de CO<sub>2</sub> na tentativa de normalizar o pH (KONSTANTINOV, 2015).

O aumento da atividade contrátil do diafragma e a produção de ROS estimulam a atividade de várias enzimas envolvidas com sinalização intracelular, como AMPK (COFFEY; HAWLEY, 2007; JI, 2015), CaMK (COFFEY; HAWLEY, 2007; HOPPELER, 2016), MAPK p38 (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007) e SIRT3 (SALVATORI et al., 2017; WHITE; SCHENK, 2012). Todas essas enzimas podem estimular PGC-1 $\alpha$  (LUNDBY; JACOBS, 2016), enzima que regula a biogênese mitocondrial (JI, 2015; WACKERHAGE; WOODS, 2002), o aumento na capacidade de oxidação lipídica (KRAMER; GOODYEAR, 2007; YAN et al., 2011), a conversão das isoformas de MHC, do tipo IIb para isoformas oxidativas, tipo IIa e tipo I (HOPPELER, 2016; WACKERHAGE; WOODS, 2002) e a angiogênese (CHINSOMBOON et al., 2009; YAN et al., 2011). Todas são alterações fenotípicas e metabólicas que tornam o músculo mais resistente à fadiga. Entretanto, AMPK e MAPK p38 podem estimular a atividade dos genes Atroquina-1 e MuRF-1, contribuindo para proteólise e atrofia tecidual (COFFEY; HAWLEY, 2007; GLASS, 2005).

O músculo diafragma de rato saudável e sedentário é composto em média por 44% de fibras tipo I, 6% fibras tipo IIa, 32% fibras tipo IIb e 18% fibras tipo IIx (DELP; DUAN, 1996).

Adaptações promovidas no músculo diafragma pelo DM são relatadas. Bestetti *et al.*, 1981, reportou redução na área de secção transversa das fibras IIb, aumento na proporção das fibras I e aumento na densidade mitocondrial no músculo diafragma de ratos diabéticos. Salvi *et al.*, 2010, mostrou em diafragmas de ratos

diabéticos redução na proporção de fibras tipo IIa e IIb, aumento na proporção de fibras tipo I, redução na  $+dF/dt$  e aumento na resistência à fadiga. Fang *et al.*, 2013, relatou em diafragmas de ratos diabéticos, redução na expressão gênica de SERCA, aumento na expressão gênica de fosfolambano, associado à redução na velocidade de liberação e recaptação de  $Ca^{++}$  pelo RS. van Lunteren & Moyer, 2013, mostraram em diafragmas de ratos diabéticos aumento na expressão de genes antioxidantes, aumentos na expressão de genes do metabolismo lipídico e redução na expressão de genes de parvalbumina, proteína relacionada com o relaxamento muscular em fibras glicolíticas (MHC tipo IIx e IIb) (CALDERÓN; BOLAÑOS; CAPUTO, 2014).

Também são relatadas adaptações fenotípicas no músculo diafragma submetido a exercício. Sugiura *et al.*, 1990, reportou após quatro semanas de treino de endurance, redução na proporção de fibras tipo IIb no diafragma de ratos. Powers *et al.*, 1992, reportou após dez semanas de treino de endurance nenhuma alteração na proporção dos tipos de fibra no diafragma, embora tenha ocorrido atrofia adaptativa nas fibras tipo IIa. Ogura *et al.*, 2005, reportou no diafragma de ratos após nove semanas de treino intervalado, aumento na proporção de fibras tipo IIa e nenhuma alteração nas fibras IIb. Estas evidências sugerem que a adaptação do músculo diafragma ao treino de endurance e ao treino intervalado são diferentes provavelmente devido à alta intensidade do treino intervalado, que gera maior estresse metabólico e estimula maior recrutamento de grandes unidades motoras e de fibras tipo II para atender a demanda da atividade (COFFEY; HAWLEY, 2007; SCHOENFELD, 2013).

A produção de força muscular depende do número de pontes cruzadas em paralelo, da predominância do tipo de fibra e do trofismo muscular (FITTS; WIDRICK, 1996).

Nas figuras 2A e 2B é possível observar que a produção de força durante contrações repetidas ( $T_{\text{máx}}$ ) em resposta ao treinamento ocorreu de forma diferente entre grupos controle e os grupos DM. Na figura 2A, comparando os grupos controle, foram observadas reduções significativas de  $T_{\text{máx}}$  do Controle Intervalado do primeiro ao quinto minuto de experimento quando comparado com Controle Sedentário e do primeiro ao terceiro minuto de experimento quando comparado com Controle Endurance. Na figura 2B, comparando os grupos DM, foi observada redução significativa no Diabete Endurance no primeiro minuto de experimento quando comparado com Diabete Sedentário. Nas comparações entre grupos, foram

observadas diferenças significativas apenas entre os grupos endurance. Representado na figura 2D, o grupo Diabete Endurance reduziu significativamente  $T_{m\acute{a}x}$  do primeiro ao terceiro minuto de experimento quando comparado ao Controle Endurance.

Para avaliar a capacidade máxima de produção de força após estímulo de endurance, a frequência de estímulo foi aumentada para 100 Hertz, onde foi registrada a força tetânica máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ , figura 5). Na comparação entre grupos, foi observada redução significativa no grupo Diabete Sedentário, resultado também descrito por Wanke *et al.*, 1991, demonstrando redução da capacidade de endurance do músculo diafragma em diabéticos com baixo controle glicêmico e, aumento significativo no Diabete Intervalado, indicativo que em animais diabéticos, o treinamento aumentou a resistência do músculo ao endurance e a capacidade de produzir força, comparado ao respectivo grupo controle. Na comparação intragrupos, observou-se no Controle Intervalado redução significava de  $F_{m\acute{a}x}$  comparado ao Controle Sedentário, resultado também descrito por Ogura *et al.*, 2005 e, atribuído à atrofia adaptativa das fibras tipo IIa. No Diabete Intervalado aumento significativo de  $F_{m\acute{a}x}$  comparado ao Diabete Sedentário, indicativo que o treinamento reduziu o efeito da doença e aumentou a resistência do músculo ao endurance.

Segundo Ogura *et al.*, 2005, durante o treinamento intervalado, a demanda anaeróbia resulta em aumento na carga de trabalho do diafragma durante as séries, durante os períodos e recuperação entre as séries e durante o período de recuperação pós-exercício, promovendo adaptações aeróbicas em maiores magnitudes quando comparado ao treinamento de endurance. De acordo com Powers *et al.*, 1997, a resposta indesejada da adaptação aeróbica é a redução da produção de força devido à atrofia adaptativa das fibras, o que justifica as reduções em  $T_{m\acute{a}x}$  (figura 2A) e em  $F_{m\acute{a}x}$  (figura 5) no grupo Controle Intervalado. No grupo Diabete Endurance foram observadas reduções em  $T_{m\acute{a}x}$  comparado ao Controle Endurance (figura 2D), porém os valores são similares aos do grupo Diabete Intervalado (figura 2B), cujo resultado foi similar ao grupo Controle Intervalado (figura 2E), um indício de que para animais diabéticos com baixo controle glicêmico, o treinamento de endurance promove adaptações contráteis semelhantes ao treinamento intervalado.

A velocidade máxima de contração ( $+dF/dt$ ) e a velocidade máxima de relaxamento ( $-dF/dt$ ) são determinadas principalmente pelo tipo predominante de

miosina de cadeia pesada presente na fibra (FITTS; WIDRICK, 1996). SERCA, a principal  $\text{Ca}^{++}$  ATPase nas células musculares, é expressa de acordo com o tipo de fibra. SERCA 1a é expressa em fibras de contração rápida, enquanto SERCA 2a é expressa em fibras de contração lenta. Adicionalmente, fibras de contração rápida apresentam 3 a 4 vezes maior concentração de SERCA quando comparado com as fibras de contração lenta. A isoforma e o volume de SERCA são diretamente relacionados com a taxa de recaptção de  $\text{Ca}^{++}$  para o RS e, diretamente relacionado com a velocidade de relaxamento (PERIASAMY et al., 2017).

Comparando as figuras 3A e 3B, pode-se observar que os músculos dos animais DM contraem com menor velocidade quando comparados aos músculos dos animais controle. Entretanto o resultado entre os grupos controle é similar (figura 3A), assim como entre os grupos DM também é (figura 3B). Reduções significativas na  $+dF/dt$  foram observadas em todos os grupos DM (figuras 3C, 3D e 3E), um indício de que pode ter havido conversão de fibras glicolíticas rápidas em fibras oxidativas lentas, como relatado por Bestetti *et al.*, 1981 e Salvi *et al.*, 2010. Nas figuras 4A e 4B, nota-se redução na velocidade de relaxamento dos músculos dos grupos DM comparado aos grupos controle. Novamente o resultado entre os grupos controle é similar (figura 4A), assim como entre os grupos DM também é (figura 4B). Reduções significativas na  $-dF/dt$  foram observadas em todos os grupos DM (figuras 4C, 4D e 4E), resultado que, segundo Fang *et al.*, 2013, além do aumento na proporção de fibras oxidativas lentas, pode ser atribuído à redução na expressão da  $\text{Ca}^{++}$  ATPase SERCA, associado à redução na velocidade de liberação e recaptção de  $\text{Ca}^{++}$  pelo RS. Na resistência à fadiga (figura 6) observou-se aumento significativo em todos os grupos DM, que pode ser associado ao aumento na proporção de fibras oxidativas e ao aumento na densidade mitocondrial, eventos que teriam tornado o músculo mais resistente à fadiga, como relatado por Bestetti *et al.*, 1981 e Salvi *et al.*, 2010.

No DM, a redução da captação de glicose, o aumento da secreção de hormônios envolvidos no metabolismo energético, o aumento da lipólise, aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres no plasma e aumento das taxas da  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias, tornariam o metabolismo lipídico a principal via energética (MAGOMEDOVA; CUMMINS, 2015; TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015; TSILOULIS; WATT, 2015; VIJAYAKUMAR et al., 2010), o que poderia causar sobrecarga lipídica mitocondrial, gerando estresse oxidativo, dano e

acúmulo de mitocôndrias disfuncionais nos músculos, reduzindo a resposta antioxidante, aumentando taxas de peroxidação lipídica e de degradação tecidual (Ji, 2015; LAKER et al., 2017). Entretanto, não foram observadas diferenças nas taxas de respiração mitocondrial entre os grupos (figura 7), indicando que a funcionalidade mitocondrial foi preservada.

Segundo Ji, 2015 e Laker *et al.*, 2017, AMPK regula o turnover proteico mitocondrial através da interação com Ulk1 e PGC-1 $\alpha$ . Ativado, Ulk1 estimula a mitofagia de mitocôndrias disfuncionais e danificadas enquanto PGC-1 $\alpha$  estimula a biogênese de novas mitocôndrias. Quando comparados os dados de consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial apenas entre os grupos controle, observamos que o grupo Controle Endurance reduziu significativamente o consumo de O<sub>2</sub>. Segundo Lundby e Jacobs, 2016, o aumento na capacidade respiratória tecidual promovida pelo treinamento de endurance não se deve somente ao aumento da densidade mitocondrial, mas principalmente devido às adaptações hematológicas, como estímulo à eritropoiese e consequente aumento da capacidade de transporte de gases pelo sangue e também devido à angiogênese e o aumento da rede capilar, fatores que permitem aumento da perfusão tecidual, aumento da entrega de oxigênio aos tecidos e aumento na remoção de metabólitos, tornando eventos de fosforilação mais eficientes e inclusive reduzindo a velocidade da cadeia de transporte de elétrons, justificando o resultado.

Não foram observadas diferenças na quantificação de ROS tecidual entre os grupos (figura 8). A quantificação de LPO tecidual (figura 9) foi significativamente diferente apenas entre os grupos endurance ( $p = 0,007$ ). Porém quando comparados os valores de LPO entre os grupos DM, não se observou diferença ( $p = 0,567$ ), indicando que não houve estresse oxidativo. Quando comparados os valores entre os grupos controle, verificou-se redução significativa entre o Controle Endurance e o Controle Sedentário ( $p = 0,005$ ). Foi observado aumento significativo na atividade de SOD (figura 10) entre os grupos DM que realizaram treinamento físico. Entretanto, o Diabete Endurance apresentou a maior atividade de SOD quando comparado entre os grupos diabéticos ( $p = 0,007$ ). A atividade de CAT (figura 11) revelou aumento significativo em todos os grupos DM. Comparando os valores da atividade de CAT entre os grupos controle, observou-se redução significativa no Controle Endurance ( $p < 0,001$ ).

O aumento da demanda muscular pode estimular a atividade da enzima mitocondrial SIRT3 (SALVATORI et al., 2017; WHITE; SCHENK, 2012), enquanto

aumentos na produção de ROS e estimulação contínua de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  podem estimular a atividade de NF $\kappa$ B no citoplasma das células musculares (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007; LAUMONIER; MENETREY, 2016). A ativação de SIRT3, bem como de AMPK, é dependente do status metabólico da célula e se relaciona com a regulação da função mitocondrial e prevenção do estresse oxidativo, estimulando a síntese de enzimas antioxidantes como SOD e CAT (SALVATORI et al., 2017; WHITE; SCHENK, 2012). NF $\kappa$ B quando ativo, se move para o núcleo das células e estimula a expressão de genes antioxidantes como SOD (JI, 2015; KRAMER; GOODYEAR, 2007), o que pode explicar por que os níveis de SOD e CAT estão aumentados nos grupos DM, justificando a manutenção dos níveis de ROS e de LPO.

Evidências reportam que o DM altera o fenótipo do músculo diafragma (BESTETTI et al., 1981; FANG et al., 2013; SALVI et al., 2010; VAN LUNTEREN; MOYER, 2013), aumentando a proporção de fibras tipo I, reduzindo a proporção e o trofismo das fibras glicolíticas tipo IIx e IIb e aumentando a densidade mitocondrial, todas essas alterações tornam o perfil muscular mais oxidativo e resistente à fadiga. Outras evidências (OGURA et al., 2005; POWERS et al., 1992; SUGIURA et al., 1990) mostram que as adaptações do músculo diafragma ao treinamento de endurance e ao treinamento intervalado são diferentes, provavelmente devido à intensidade da realização do exercício.

A alta intensidade do treinamento intervalado estimula aumento da demanda metabólica e funcional, aumento da frequência e da intensidade das contrações diafragmáticas com consequente aumento no recrutamento de grandes unidades motoras contendo fibras glicolíticas tipo IIx e IIb para sustentação da contração muscular (COFFEY; HAWLEY, 2007; OGURA et al., 2005). O estresse metabólico e mecânico gerado pelo exercício de alta intensidade aumenta a carga de trabalho do músculo diafragma e estimula a manutenção da proporção e o trofismo das fibras glicolíticas tipo II (COFFEY; HAWLEY, 2007; SCHOENFELD, 2013).

Devido à baixa carga de trabalho gerada pelo treinamento de endurance no músculo diafragma, a resposta adaptativa parece ser relacionada com aumento na proporção de fibras tipo I e redução do volume e trofismo das fibras glicolíticas tipo II (POWERS et al., 1992; SUGIURA et al., 1990). Estas adaptações são na mesma direção que as adaptações causadas pelo DM (BESTETTI et al., 1981; SALVI et al., 2010), porém não patológicas. Quando unidos fatores que estimulem a redução da

proporção e do trofismo das fibras glicolíticas tipo II e estimule o estresse oxidativo, uma consequência pode ser a redução da capacidade funcional do músculo diafragma acompanhado da redução da capacidade respiratória.

Os dados de contratilidade revelaram que o grupo Diabetes Intervalado comparado ao grupo Diabetes Sedentário aumentou a resistência à fadiga (figuras 3B e 6) e aumentou a capacidade de produzir força após estímulo de endurance (figura 5). Em todos os grupos DM observamos manutenção da funcionalidade mitocondrial (figura 7) e não foram observadas diferenças significativas em ROS e LPO (figuras 8 e 9), demonstrando que não houve estresse oxidativo. Porém observamos aumento de 85% na atividade de SOD no Diabetes Endurance em relação ao Diabetes Sedentário e 87,9% em relação ao Diabetes Intervalado, o que pode indicar que o treinamento de endurance estimulou o estresse oxidativo, que foi acompanhado pelo aumento da atividade do sistema antioxidante. No Controle Endurance foi observada redução significativa de LPO e na atividade de CAT, indicativo de que o treinamento de endurance para populações saudáveis pode reduzir o estresse oxidativo no músculo diafragma.



## **6 CONCLUSÃO**

Nossos dados sugerem que o treinamento intervalado de alta intensidade, devido a menor duração, maior carga de trabalho e o maior recrutamento de grandes unidades motoras, possivelmente estimule a manutenção do volume e do trofismo das fibras tipo II, predominantes no músculo diafragma. Portanto, para portadores de DM, as adaptações promovidas pelo treinamento intervalado de alta intensidade parecem ser mais efetivas e benéficas quando comparadas com as adaptações promovidas pelo treinamento de endurance.



## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- ALAMEDDINE, H. S.; MORGAN, J. E. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 3, n. 4, p. 455–473, 2016.
- ANDERSON, J. C. Measuring breath acetone for monitoring fat loss: Review. **Obesity**, v. 23, n. 12, p. 2327–2334, 2015.
- ANDERSSON, D. C. et al. Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 24, p. 6381–6387, 2012.
- ARONSON, P. S.; GIEBISCH, G. Effects of pH on Potassium: New Explanations for Old Observations. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 1981–1989, 2011.
- BESTETTI, G. et al. Neuropathy and myopathy in the diaphragm of rats after 12 months of streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Acta Neuropathologica**, v. 55, n. 1, p. 11–20, 1981.
- BOND, P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BOUSHEL, R. et al. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 50, n. 4, p. 790–796, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CAIRNS, S. P.; BORRANI, F.  $\beta$ -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: Key role of excitation-contraction coupling. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 21, p. 4713–4727, 2015.
- CALDERÓN, J. C.; BOLAÑOS, P.; CAPUTO, C. The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 133–160, 2014.
- CHAPMAN, M. A.; MEZA, R.; LIEBER, R. L. Skeletal muscle fibroblasts in health and disease. **Differentiation**, v. 92, n. 3, p. 108–115, 2016.
- CHINSOMBOON, J. et al. The transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21401–21406, 2009.
- COFFEY, V.; HAWLEY, J. The Molecular Bases of Training Adaptation. **Sports Medicine**, v. 37, n. 9, p. 737–763, 2007.

DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I , IIA , IID / X , and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 1, p. 261–270, 1996.

DUMONT, N. A. et al. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. July, p. 1027–1059, 2015.

FAGERHOLM, V.; HAAPARANTA, M.; SCHEININ, M. A 2-Adrenoceptor Regulation of Blood Glucose Homeostasis. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 108, n. 6, p. 365–370, 2011.

FAJARDO, V. A. et al. Co-Expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2013.

FANG, Y. et al. Diaphragm dysfunction and expressions of calcium regulatory proteins in diabetic rats. **Journal of Southern Medical University**, v. 33, n. 2, p. 177–81, 2013.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. **Federação Internacional de Diabetes**. Disponível em: [www.idf.org](http://www.idf.org)

FERRARO, E. et al. Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 154–176, 2014.

FERREIRA, L. F. et al. Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 299, p. C552–C560, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–248, 2000.

FITTS, R. H. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p. 551–558, 2007.

FITTS, R. H.; WIDRICK, J. J. Muscle Mechanics: Adaptations with Exercise Training. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 24, n. 1, p. 427–474, 1996.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 2015.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41–45, 1998.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1974–1984, 2005.

GROSS, R. et al.  $\alpha$ 2-Adrenergic Potentiation of Adenosine-Stimulating Effect on Glucagon Secretion. **Endocrinology**, v. 121, n. 2, p. 765–769, 1987.

GUERREIRO, L. F. et al. Oxidative Status of the Myocardium in Response to Different Intensities of Physical Training. **Physiological Research**, v. 65, n. 5, p.

737–749, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology & Medicine**. 5a ed. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HASENOUR, C. M.; BERGLUND, E. D.; WASSERMAN, D. H. Emerging Role of AMP activated Protein Kinase in Endocrine Control of Metabolism in the Liver. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 366, n. 2, p. 152–162, 2014.

HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiologica**, v. 192, n. 1, p. 127–135, 2008.

HENDERSON, C. A. et al. Overview of the muscle cytoskeleton. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 3, p. 891–944, 2017.

HENSELMANS, M.; SCHOENFELD, B. J. The Effect of Inter-Set Rest Intervals on Resistance Exercise-Induced Muscle Hypertrophy. **Sports Medicine**, v. 44, n. 12, p. 1635–1643, 2014.

HOPPELER, H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 2, p. 205–213, 2016.

HOSTRUP, M. et al.  $\beta$ 2-Adrenergic stimulation enhances  $\text{Ca}^{2+}$  release and contractile properties of skeletal muscles, and counteracts exercise-induced reductions in  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$   $V_{\text{max}}$  in trained men. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 24, p. 5445–5459, 2014.

Jl, L. L. Redox signaling in skeletal muscle: role of aging and exercise. **Advances in Physiology Education**, v. 39, n. 4, p. 352–359, 2015.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

JUEL, C.; HALESTRAP, A. P. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. **The Journal of physiology**, v. 517, n. 3, p. 633–642, 1999.

KAMATA, H. et al. Hydrogen peroxide activates I $\kappa$ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. **FEBS Letters**, v. 519, n. 1–3, p. 231–237, 2002.

KANNISTO, K. et al. Differential expression of peroxisomal proliferator activated receptors alpha and delta in skeletal muscle in response to changes in diet and exercise. **International journal of molecular medicine**, v. 17, n. 1, p. 45–52, 2006.

KERKSICK, C.; ZUHL, M. Mechanisms of Oxidative Damage and Their Impact on Contracting Muscle. In: LAMPRECHT, M. (Ed.). **Antioxidants in Sport Nutrition**. [s.l.] CRC Press, 2014. p. 1–16.

KESTON, A. S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 1965.

KIM, Y.; PARK, Y. Conjugated linoleic acid (CLA) stimulates mitochondrial biogenesis signaling by the upregulation of PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in C2C12 cells. **Lipids**, v. 50, n. 4, p. 329–338, 2015.

KIZUB, I. V.; KLYMENKO, K. I.; SOLOVIEV, A. I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 2, p. 230–242, 2014.

KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA, F. et al. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. **Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 4, p. 221–232, 2014.

KONSTANTINOV, N. K. Respiratory failure in diabetic ketoacidosis. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 8, p. 1009, 2015.

KORTE, S. M. et al. The Darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 3–38, 2005.

KRAMER, H.; GOODYEAR, L. Exercise, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 388–395, 2007.

LAKER, R. C. et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–13, 2017.

LAUMONIER, T.; MENETREY, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 3, n. 1, p. 15, 2016.

LEBEL, C. P. et al. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: The potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 104, n. 1, p. 17–24, 1990.

LEE, K. et al. Activation of AMP-activated protein kinase induce expression of FoxO1, FoxO3a, and myostatin after exercise-induced muscle damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 15, p. 1–26, 2015.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibre. **Nature**, v. 418, n. August, p. 797–802, 2002.

LUNDBY, C.; JACOBS, R. A. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 1, p. 17–22, 2016.

MAGOMEDOVA, L.; CUMMINS, C. Glucocorticoids and Metabolic Control. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 1–21, 2015.

MAJORCZYK, M.; SMOLAŁ, D. Effect of physical activity on IGF-1 and IGFBP levels in the context of civilization diseases prevention. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 67, n. 2, p. 105–111, 2016.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. **Bioquímica do Exercício e do Treinamento**. 1a. ed. [s.l.] Manole, 2000.

MICHAELSON, L.; ILER, C.; WARD, C. ROS and RNS signaling in skeletal muscle:

critical signals and therapeutic targets. **Annual Review of Nursing Research**, v. 31, n. July, p. 367–387, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde**. Disponível em: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)

MOHAMAD, I. L. et al. Evaluation of pulmonary function changes in children with type 1 diabetes mellitus in Upper Egypt. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v. 6, n. 3, p. 87–91, 2015.

MORRIS, C.; HOMSHER, E. The use of caged compounds. In: SUGI, H. (Ed.). **Current methods in muscle physiology. Advantages, problems and limitations**. [s.l.] Oxford Science Publications, 1998. p. 71–89.

MUÑOZ, V. R. et al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 6, p. 4791–4800, 2018.

MUSI, N.; YU, H.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 1, p. 191–195, 2003.

NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 53, n. 1, p. 124–144, 2014.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principios de Bioquímica**. 7a. ed. [s.l.] Sarvier, 2018.

NOTARIUS, C. F.; MILLAR, P. J.; FLORAS, J. S. Muscle sympathetic activity in resting and exercising humans with and without heart failure. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. August, p. 1–9, 2015.

O'CONNELL, J. M.; WEIR, J. M.; MACINTOSH, B. R. Blood lactate accumulation decreases during the slow component of oxygen uptake without a decrease in muscular efficiency. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 469, n. 10, p. 1–9, 2017.

OGASAWARA, R. et al. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal Of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 306, p. 1155–1162, 2014.

OGURA, Y. et al. Sprint-interval training-induced alterations of Myosin heavy chain isoforms and enzyme activities in rat diaphragm: effect of normobaric hypoxia. **The Japanese journal of physiology**, v. 55, n. 6, p. 309–316, 2005.

OH, T. et al. Effects of high-intensity swimming training on the bones of ovariectomized rats. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 39–45, 2016.

PEINADO, A. B. et al. Responses to increasing exercise upon reaching the anaerobic threshold, and their control by the central nervous system. **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 6, n. 1, p. 17, 2014.

PERIASAMY, M. et al. Role of SERCA pump in muscle thermogenesis and metabolism. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 3, p. 879–890, 2017.



PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In: **Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 810p. 25–59.

POWERS, S. K. et al. Diaphragmatic fiber type specific adaptation to endurance exercise. **Respiration Physiology**, v. 89, n. 2, p. 195–207, 1992.

POWERS, S. K. Exercise: Teaching myocytes new tricks. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 2, p. 460–472, 2017.

POWERS, S. K.; COOMBES, J.; DEMIREL, H. Exercise training-induced changes in respiratory muscles. **Sports Medicine**, v. 24, n. 2, p. 120–131, 1997.

REDDISH, F. N. et al. Calcium dynamics mediated by the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum and related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1–21, 2017.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 993–1017, 2013.

RIGOARD, P. et al. Molecular architecture of the sarcoplasmic reticulum and its role in ECC. **Neurochirurgie**, v. 55, n. SUPPL. 1, p. 83–91, 2009.

ROCKL, K. et al. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-Activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. **Diabetes**, v. 56, n. August, p. 2062–2069, 2007.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004.

ROSE, A. J.; RICHTER, E. A. Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulated? **Physiology**, v. 20, n. 4, p. 260–270, 2005.

RUSSELL, A. P. Molecular regulation of skeletal muscle mass. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 378–384, 2010.

SALVATORI, I. et al. SIRT3 and mitochondrial metabolism in neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 109, p. 184–192, 2017.

SALVI, N. et al. Upregulation of PPAR $\beta/\delta$  is associated with structural and functional changes in the type I diabetes rat diaphragm. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1–9, 2010.

SANCHEZ, A. M. J. et al. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 8, p. R956–R969, 2014.

SATO, K.; IEMITSU, M. Exercise and sex steroid hormones in skeletal muscle. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, p. 200–205, 2015.

SCHOENFELD, B. J. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. **Sports Medicine**, v. 43, n. 3, p. 179–194, 2013.

SHAIKH, S. A. et al. Phospholamban and Sarcolipin: Are they functionally redundant

or distinct regulators of the Sarco Endo plasmic Reticulum Calcium ATPase? **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 91, n. February, p. 81–91, 2016.

SHEFER, G.; BENAYAHU, D. The effect of exercise on IGF-I on muscle fibers and satellite cells. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, n. 7, p. 230–9, 2012.

SNYMAN, C.; NIESLER, C. U. MMP-14 in skeletal muscle repair. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 36, n. 3, p. 215–225, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Disponível em: [www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)

STAMMERS, A. et al. The regulation of sarco (endo) plasmic reticulum calcium-ATPases ( SERCA ). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. January, p. 1–12, 2015.

SUGIURA, T. et al. **Myosin heavy chain isoform changes in rat diaphragm are induced by endurance training** **Japanese Journal of Physiology**, 1990.

SUH, S.-H.; PAIK, I.-Y.; JACOBS, K. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. **Molecules and Cells**, v. 23, n. 3, p. 272–279, 2007.

SWEENEY, H.; HAMMERS, D. Muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 11, p. 1–13, 2018.

TATSUMI, R. Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. **Animal Science Journal**, v. 81, n. 1, p. 11–20, 2010.

TREFTS, E.; WILLIAMS, A. S.; WASSERMAN, D. H. Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 135, p. 203–225, 2015.

TSILOULIS, T.; WATT, M. J. **Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 135

UZ- ZAMAN, S. Assessment of Lung Function by Spirometry and Diffusion Study and Effect of Glycemic Control on Pulmonary Function in Type 2 Diabetes Mellitus Patients of the Eastern India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 11, p. 1–4, 2014.

VAN LUNTEREN, E.; MOYER, M. Gene expression profiling in the type 1 diabetes rat diaphragm. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7832, 2009.

VAN LUNTEREN, E.; MOYER, M. Gene expression of sternohyoid and diaphragm muscles in type 2 diabetic rats. **BMC Endocrine Disorders**, v. 13, p. 1–23, 2013.

VIJAYAKUMAR, A. et al. Biological Effects of Growth Hormone on Carbohydrate and Lipid Metabolism. **Growth Hormone IGF Research**, v. 20(1), n. February, p. 1–14, 2010.

VRABAS, I. S. et al. Endurance training reduces the rate of diaphragm fatigue in vitro. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 11, p. 1605–1612, 1999.

WACKERHAGE, H.; WOODS, N. M. Exercise-induced signal transduction and gene regulation in skeletal muscle. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 1, n. 4, p. 103–114, 2002.

WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR $\delta$ . **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. 1532–1540, 2004.

WANKE, T. et al. Inspiratory Muscle Performance and Pulmonary Function Changes in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. **American Review of Respiratory Disease**, v. 143, n. 1, p. 97–100, 1991.

WANKE, T. et al. Phrenic nerve function in type 1 diabetic patients with diaphragm weakness and peripheral neuropathy. **Respiration; international review of thoracic diseases**, v. 59, n. 4, p. 233–7, 1992.

WHITE, A. T.; SCHENK, S. NAD<sup>+</sup>/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 3, p. E308–E321, 2012.

YAN, Z. et al. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 1, p. 264–274, 2011.

ZANOUE, N.; GAILLY, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 21, p. 4117–4130, 2013.



## APÊNDICES

Tabela I: Valores de  $T_{\text{máx}}$  em  $\text{N/cm}^2 \pm \text{epm}$

Tempo	CS	DS	CE	DE	CI	DI
1min	$4.02 \pm 0.14$	$3.77 \pm 0.15$	$3.98 \pm 0.21$	$3.27 \pm 0.16$	$3.35 \pm 0.12$	$3.38 \pm 0.19$
2min	$3.76 \pm 0.11$	$3.39 \pm 0.13$	$3.67 \pm 0.19$	$3.02 \pm 0.13$	$3.10 \pm 0.09$	$3.12 \pm 0.16$
3min	$3.28 \pm 0.09$	$2.89 \pm 0.11$	$3.11 \pm 0.16$	$2.59 \pm 0.08$	$2.72 \pm 0.07$	$2.72 \pm 0.11$
4min	$2.83 \pm 0.05$	$2.47 \pm 0.11$	$2.61 \pm 0.10$	$2.23 \pm 0.06$	$2.37 \pm 0.06$	$2.38 \pm 0.07$
5min	$2.47 \pm 0.04$	$2.12 \pm 0.10$	$2.22 \pm 0.07$	$1.94 \pm 0.06$	$2.05 \pm 0.04$	$2.12 \pm 0.07$
6min	$2.16 \pm 0.04$	$1.87 \pm 0.10$	$1.94 \pm 0.07$	$1.73 \pm 0.06$	$1.81 \pm 0.04$	$1.94 \pm 0.07$
7min	$1.91 \pm 0.04$	$1.66 \pm 0.10$	$1.73 \pm 0.08$	$1.57 \pm 0.06$	$1.65 \pm 0.05$	$1.82 \pm 0.07$

Tabela II: Valores de  $+dF/dt$  em  $\text{N/cm}^2/\text{s} \pm \text{epm}$

Tempo	CS	DS	CE	DE	CI	DI
1min	$311.02 \pm 5.48$	$251.37 \pm 9.09$	$293.80 \pm 9.51$	$229.52 \pm 6.63$	$277.30 \pm 8.64$	$230.84 \pm 5.12$
2min	$283.92 \pm 6.51$	$224.95 \pm 9.64$	$265.90 \pm 6.44$	$217.47 \pm 6.42$	$259.56 \pm 11.46$	$221.53 \pm 5.05$
3min	$251.42 \pm 8.19$	$195.84 \pm 9.43$	$232.82 \pm 6.60$	$190.12 \pm 5.79$	$225.84 \pm 10.88$	$200.11 \pm 7.53$
4min	$224.89 \pm 7.27$	$173.57 \pm 9.20$	$207.72 \pm 8.81$	$171.97 \pm 6.47$	$199.19 \pm 8.90$	$182.71 \pm 8.58$
5min	$200.37 \pm 7.01$	$152.59 \pm 9.88$	$181.26 \pm 9.03$	$156.81 \pm 7.20$	$177.89 \pm 6.41$	$169.23 \pm 8.86$
6min	$176.40 \pm 6.47$	$134.46 \pm 9.64$	$162.81 \pm 9.33$	$143.43 \pm 8.07$	$159.71 \pm 6.06$	$159.70 \pm 9.00$
7min	$154.31 \pm 6.72$	$115.21 \pm 9.77$	$147.24 \pm 9.93$	$129.90 \pm 7.45$	$145.44 \pm 5.32$	$150.23 \pm 8.79$

Tabela III: Valores de  $-dF/dt$  em  $\text{N/cm}^2/\text{s} \pm \text{epm}$

Tempo	CS	DS	CE	DE	CI	DI
1min	$-107.23 \pm 5.31$	$-75.54 \pm 5.05$	$-117.59 \pm 9.95$	$-65.82 \pm 6.84$	$-104.53 \pm 5.28$	$-64.40 \pm 6.38$
2min	$-75.06 \pm 3.23$	$-65.06 \pm 4.37$	$-84.36 \pm 4.13$	$-55.76 \pm 4.04$	$-78.02 \pm 3.53$	$-55.75 \pm 4.50$
3min	$-47.49 \pm 3.28$	$-42.13 \pm 3.19$	$-47.56 \pm 4.61$	$-36.66 \pm 3.16$	$-50.69 \pm 3.62$	$-38.35 \pm 3.31$
4min	$-32.23 \pm 2.79$	$-31.54 \pm 2.59$	$-33.16 \pm 3.64$	$-29.35 \pm 2.84$	$-35.49 \pm 3.05$	$-32.79 \pm 3.11$
5min	$-27.98 \pm 2.33$	$-27.41 \pm 2.06$	$-26.41 \pm 2.78$	$-25.87 \pm 2.22$	$-27.58 \pm 2.53$	$-31.07 \pm 2.96$
6min	$-24.97 \pm 1.93$	$-26.06 \pm 1.66$	$-23.95 \pm 2.63$	$-22.89 \pm 1.82$	$-23.06 \pm 1.92$	$-28.04 \pm 2.09$
7min	$-23.46 \pm 1.45$	$-24.80 \pm 1.39$	$-21.89 \pm 2.43$	$-22.07 \pm 1.47$	$-20.82 \pm 1.87$	$-26.32 \pm 1.90$